T7 RNA ポリメラーゼを用いた新規な DNA シークエンス解析法としての「転写シークエンス法」の開発

Development of “Transcriptional Sequencing Method” as a Novel DNA Sequencing Method Using T7 RNA Polymerase

2007 年 7 月

伊澤　真樹

第 1 章　DNA シークエンス解析法
1.1. DNA シークエンス解析法開発の歴史……1
1.2. DNA シークエンス解析法の原理……2
1.3. CS 法の問題点……8
1.4. 本博士論文研究の意義……9
参考文献

第 2 章　研究方法
2.1. 菌株……13
　2.1.1. 供試菌株……13
2.2. DNA 調製法および保存法……13
　2.2.1. プラスミド DNA 調製法……13
　2.2.2. 宿主大腸菌の凍結保存法……14
　2.2.3. DNA の保存法……14
2.3. DNA 解析法……14
　2.3.1. アガロース電気泳動法……14
　2.3.2. Ethanol(EtOH)沈殿法……15
　2.3.3. PCR 法……15
　2.3.4. 制限酵素による DNA の処理法……15
　2.3.5. アガロースゲルからの DNA 抽出法……15
　2.3.6. DNA の脱リン酸化処理……16
　2.3.7. DNA のライゲーション……16
　2.3.8. DNA の大腸菌への形質転換法……16
　2.3.9. 分光光度計を用いた DNA 定量法……16
　2.3.10 DNA シークエンス解析法……17
参考文献

第 3 章　T7 RNAP の基質として認識可能な蛍光ターミネーターの開発
3.1. 緒言……18
3.2. 実験方法……18
　3.2.1. 蛍光ターミネーターの構築……18
　3.2.2. T7 RNAP による蛍光ターミネーターの取り込み実験……19
3.3. 実験結果……19
　3.3.1. 蛍光ターミネーターの構築……19
　3.3.2. T7 RNAP による蛍光ターミネーターの取り込みの評価……21
3.4. 考察……24
3.5. 結語……25
参考文献

第 4 章　蛍光ターミネーターの取り込みの改善した T7 RNAP 変異体の構築
4.1. 緒言……27
4.2. 実験方法……27
　4.2.1. T7 RNAP タンパク質発現ベクターの構築……27
　4.2.2. T7 RNAP 変異体の構築および T7 RNAP タンパク質の精製……28
　4.2.3. T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の polymerase 活性の比較……30
　4.2.4. T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の伸長活性の比較……30
　4.2.5. T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の各 3'-dATP に対する取り込み効率の比較……30
　4.2.6. T7 RNAP 変異体 F644Y と野生型 T7 RNAP による 3'-dATP 添加による RNA 合成実験……31

4.2.7. T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y と野生型 T7 RNAP の各 3'-dNTP の取り込み効率の比較……31
4.2.8. T7 RNAP 変異体 F644Y と野生型 T7 RNAP による蛍光ターミネーターを用いた RNA 合成実験……31
4.3. 実験結果……32
4.3.1. T7 RNAP 変異体の構築……32
4.3.2. 変異導入による T7 RNAP の酵素活性への影響……34
4.3.3. 3'-dATP 濃度変化による T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y と野生型 T7 RNAP 伸長反応の相違点……37
4.3.4. T7 RNAP 変異体 F644Y、F667Y および野生型 T7 RNAP の各 3'-dNTP の取り込み効率の比較……39
4.3.5. T7 RNAP 変異体 F644Y を用いた蛍光ターミネーターの取り込み効率改善による効果……40
4.4. 考察……41
4.5. 結語……42
参考文献

第 5 章　TS 法の構築
5.1. 緒言……44
5.2. 実験方法……44
5.2.1. 鋳型 DNA の調製……44
5.2.2. T7 RNAP によるヌクレオチドアナログの取り込み実験……45
5.2.3. Pyrophosphatase タンパク質の精製……45
5.2.4. ヌクレオチドアナログを添加した TS 反応……46
5.2.5. CS 法と TS 法の最適鋳型 DNA 量の比較実験……46
5.2.6. RNA 合成反応の促進効果を有するポリアミンの探索……46
5.2.7. TS 法におけるポリアミン添加による効果の検討……47
5.3. 実験結果……47
5.3.1. T7 RNAP によるヌクレオチドアナログ取り込み条件の検討……47
5.3.2. ヌクレオチドアナログ添加による TS 法におけるコンプレッションの解消……50
5.3.3. TS 法の構築と TS 法の特長についての評価……52
5.3.4. ポリアミン添加による TS 法への効果の検討……56
5.4. 考察……59
5.5. 結語……60
参考文献

第 6 章　TS 法によるシークエンス反応時間の優位性の評価
6.1. 緒言……62
6.2. 実験方法……62
6.2.1. 鋳型 DNA の調製……62
6.2.2. *EGFR* PCR 産物の TS 法による DNA シークエンス解析……62
6.2.3. pTS1 ベクターの構築……63
6.2.4. CS 法と TS 法の反応時間の比較実験……64
6.3. 実験結果……64
6.3.1. TS 法におけるシークエンス反応時間の評価……64
6.3.2. pTS1 ベクターの構築……67
6.3.3. TS 法と CS 法におけるシークエンス反応時間の比較……68
6.4. 考察……69
6.5. 結語……70

参考文献

第 7 章　TS 法を用いた難解読領域の DNA シークエンス解析法の構築
7.1. 緒言……72
7.2. 実験方法……72
7.2.1. TS 法を用いた難解読領域の DNA シークエンス解析……72
7.2.2. 難解読領域を有する MDA 産物の TS 法を用いた DNA シークエンス解析……73
7.3. 実験結果……74
7.3.1. 難解読領域の TS 法を用いた DNA シークエンス解析……74
7.3.2. 難解読領域を有する MDA 産物の TS 法による DNA シークエンス解析……79
7.3.3. TS 法による難解読 DNA シークエンス解析の応用……82
7.4. 考察……85
7.5. 結語……87
参考文献

第 8 章　総括……90

履歴書
研究業績
謝辞

第１章　DNAシークエンス解析法

1.1. DNAシークエンス解析法開発の歴史

DNAシークエンス解析法は、DNA分子を構成する４種の塩基（A、T、G、C）の配列順を解読する方法であり、遺伝子関連研究のみならず遺伝子検査などの臨床分野においても広く使用されている遺伝子解析技術の基礎をなす技術である。

DNAシークエンス解析法は、1977年にマキサムおよびギルバートにより、化学反応を用いたマキサム-ギルバート法[1]が開発された。方法の概要は以下の通りである。まず、DNAシークエンス解析を行いたいDNA断片の5'または3'末端をT4 polyncleotide kinaseによって放射性同位体（RI）で標識したのち、塩基種特異的に反応する薬剤を用いて部分分解する。つぎに部分分解したDNA断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離することでDNAシークエンス解析を行うものである。マキサム-ギルバート法は開発してしばらくの間は後述するジデオキシ法と比べて広く用いられていたが、ジデオキシ法の開発およびその後の改良に伴って現在はほとんど使われていない。

マキサム-ギルバート法が開発された年と同じ1977年に、サンガーらがFig. 1.1に示すような酵素反応を利用したDNAシークエンス解析法を開発した[2]。ジデオキシ法と称されるこの方法は、DNAシークエンス解析を行いたいDNAに相補的な配列を有するDNAをDNA polymerase（DNAP）により合成する際にDNA合成反応の開始に必要なDNAオリゴヌクレオチド（プライマー）、DNAPの基質となるRI標識deoxynucleotide triphosphate(dNTP)とともにDNA合成の反応終結剤として機能するdideoxynucleotide triphosphate(ddNTP)を反応液に添加することでDNA合成反応を部分的に終結させたDNA断片ができることを利用した方法である。このDNA合成反応により塩基種ごとに調製したDNA断片を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離することでDNAシークエンス解析を行うことができる。

ジデオキシ法は、サンガーらによって開発された従来法に基づいてさらなる改良がそののち加えられ、RIを用いたDNA標識ではなく蛍光を用いたDNA断片の標識を耐熱性DNAPのDNA合成反応において行うサイクルシークエンス法（CS法）が開発された[3]。CS法は従来のRIを用いた方法と比較して放射線被爆のリスクや管理区域などでの実験が必要ないという利点の他にDNAシークエンス解析に必要な鋳型DNA量が少ないなどの利点を有する。CS法は蛍光自動シークエンサーとともに現在のDNAシークエンス解析法の主流となっており、CS法を用いてこれまでにヒトなどの多くの生物のゲノムDNAを対象にした大規模な塩基配列解析プロジェクトが進行している[4, 5]。さらにCS法を用いたDNAシークエンス解析法は基礎研究分野のみならず疾患の遺伝子診断や医薬品に対する副作用の発現予測などのテーラーメード医療分野への応用も進んできている。

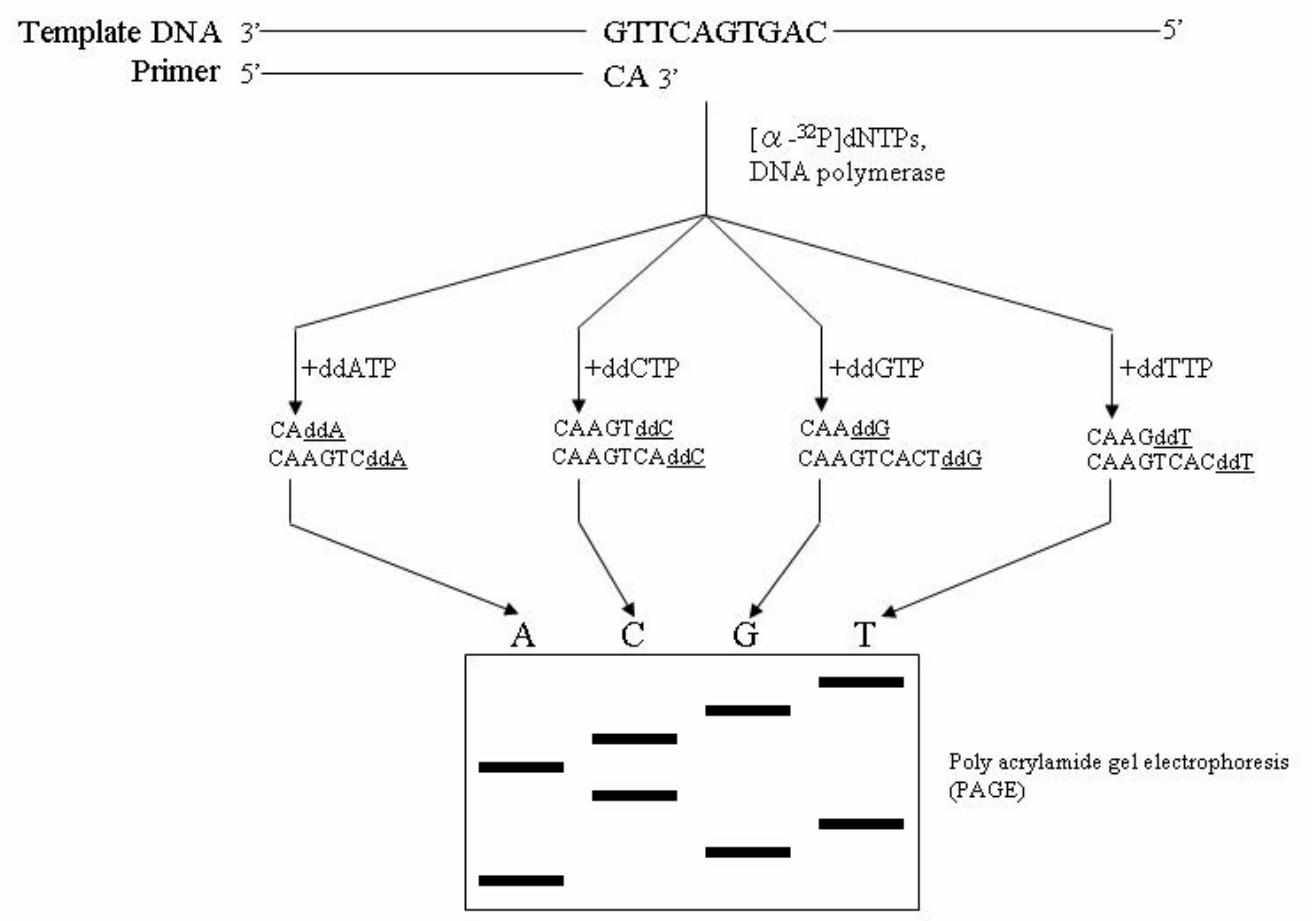

Fig. 1.1 Procedure of dideoxy sequencing reaction.

1.2. DNAシークエンス解析法の原理

ここではまず、CS法の基本原理でもあるジデオキシ法の原理について説明する。Fig. 1.1に示すように、シークエンス解析を行いたい2本鎖DNAは、反応前に1本鎖DNA依存的DNAPの鋳型DNAとするためにアルカリ変性や熱変性により1本鎖DNAとする必要がある。つぎに、1本鎖DNAとした鋳型DNAとともに、1本鎖DNA依存的DNAP、プライマー、4種類のdNTPと1種類のddNTPをひとつの反応液中に添加してDNA合成反応を行う。この反応はddNTP種ごとに行う必要があるため同時に４つの独立した反応を行う。

ジデオキシ反応におけるDNA合成反応は1本鎖DNA依存的DNAP（EC2.7.7.7）により触媒され、実際には*E. coli*由来のDNA polymerase変異体であるKlenow Fragment[(1)]や*E. coli*ファージであるT7ファージ由来のT7 DNA polymerase[(6)]がDNAPとして用いられる。DNAPはFig. 1.3に示すように合成DNA鎖の3'末端と基質として取り込んだdNTPの5'側のトリリン酸の間で縮合反応を起こし、ヌクレオチド間にホスホジエステル結合を形成させるとともにピロリン酸を産生する反応を触媒する酵素であり、DNA合成反応は鋳型DNAとなる1本鎖DNAの相補鎖において

5'→3'の方向に進行する。

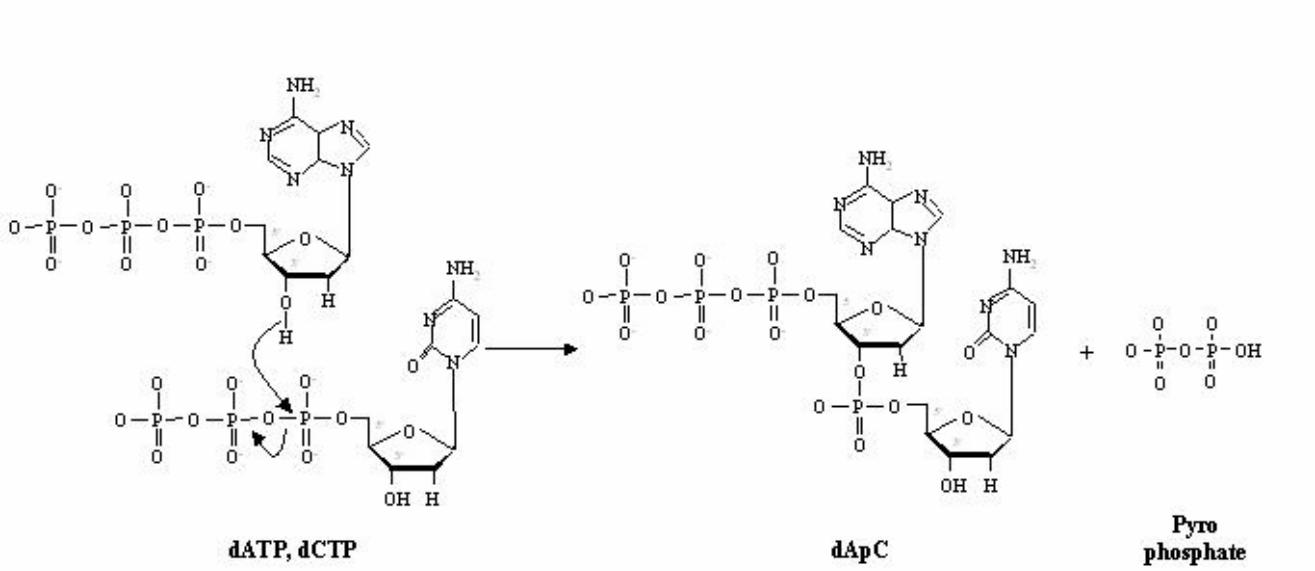

Fig. 1.2. Reaction Mechanism of DNAP Catalyzed Reaction.

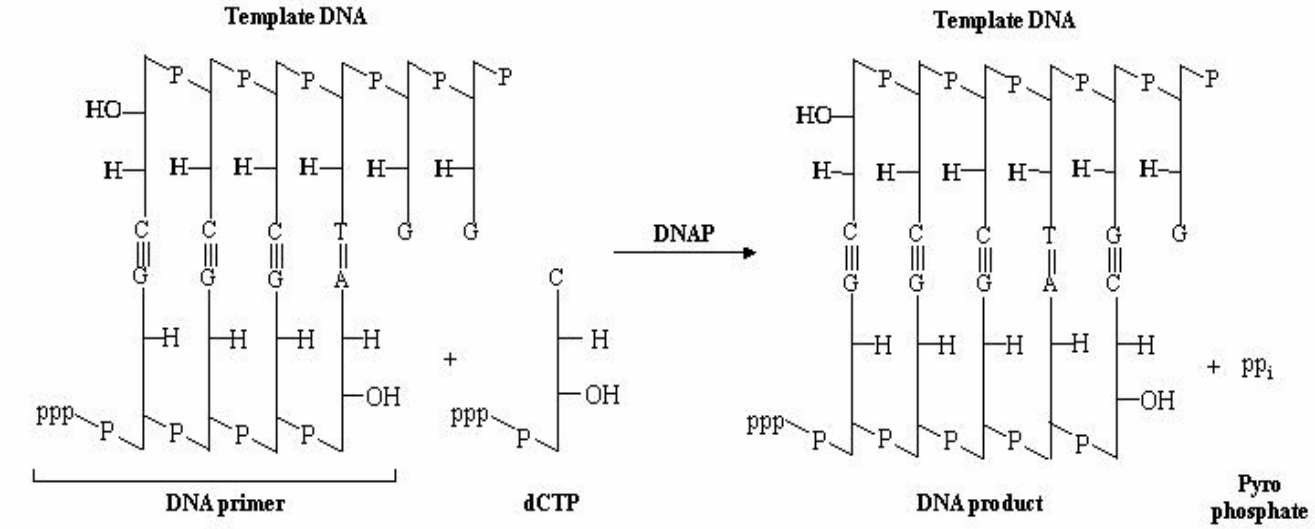

Fig. 1.3 DNAP Reaction.

Fig. 1.4にはDNAPの基質としてジデオキシ法で用いるdNTPとddNTPのうちdATPとddATPの化学式を例として示している。ジデオキシ反応においては同一反応液中にdNTPとddNTPが存在し、DNAPにより両方がその基質として認識され合成DNA鎖に取り込まれる。dNTPとddNTPではリボースの3'位における置換基がそれぞれOH基とH基となっており、ジデオキシ法においてはこの構造の違いによりDNAPによる取り込み後のDNA反応過程が異なることを利用する点が重要な部分である。

このDNA合成反応においてddNTPが基質として取り込まれた場合にはddNTPのリボースの3'末端に次のヌクレオチドを連結するために必要なOH基を持たないためdNTPの代わりにddNTPが取り込まれるとそこでDNA合成鎖の伸長が停止する。

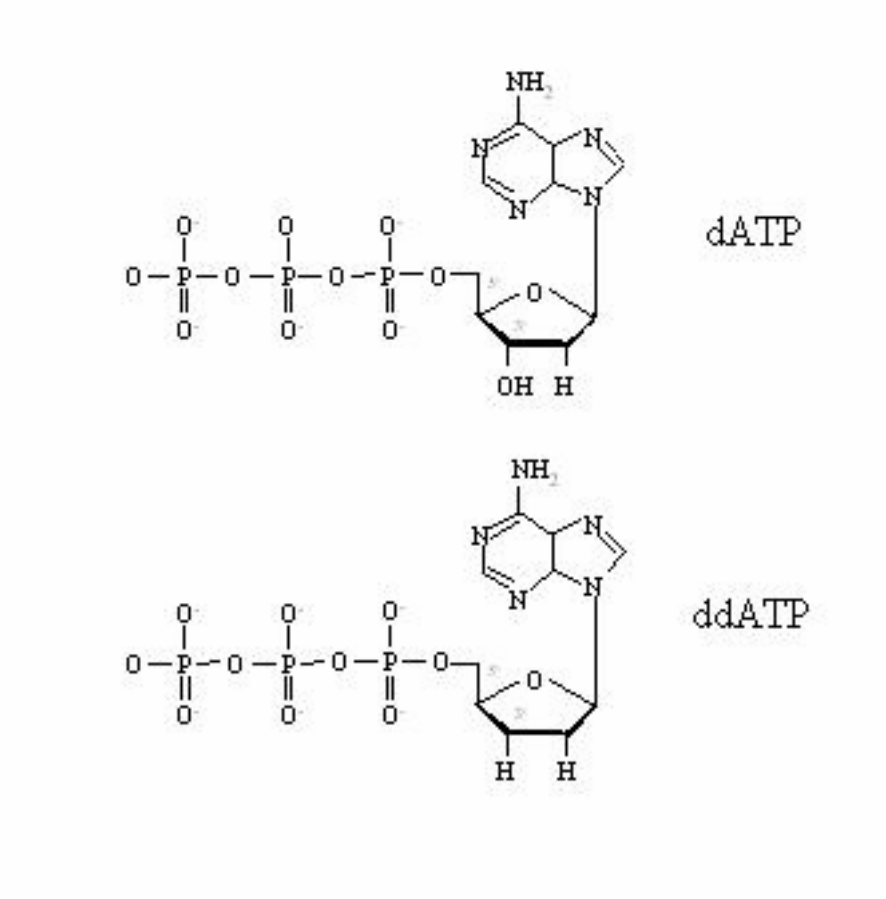

Fig. 1.4 Structure of dATP and ddATP.

このような2種類の基質とともに、ジデオキシ法においてはRI標識したdNTPおよびDNAシークエンス解析を行いたいDNA領域の5'側の上流配列と相補的な配列を有するプライマーを用いてDNA合成反応を行う。dNTPのいずれかにP^{32}等のRIで標識したものを用いることで、ddNTPの取り込みにより反応停止したDNA断片をRIにより標識することができる。具体的には、ある反応液中に例えば4種類のdNTPとddATPが添加されている条件下では、DNA配列のAを合成する場合にdATPを取り込んだ際にはDNA合成反応はさらに進行し、ddATPの場合にその時点で伸長反応は停止する。前者の場合については、つぎの配列がA以外のものである場合にはDNA鎖の伸長反応がさらに進行するが、再度、Aの配列を合成する場合には再度dATPとddATPの競合的な反応が起こる。このような反応過程を繰り返すことにより、合成されたDNA鎖の3'末端にddATPが取り込まれた様々な鎖長のDNA断片を合成することができる。同様の反応をddGTP, ddCTP, ddTTPを添加して行うことにより合成DNA鎖の3'末端にそれぞれのddNTPが取り込まれた様々な鎖長の1本鎖DNA断

片を調製することができる。調製した様々な鎖長の1本鎖DNA断片は尿素入りの変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離する。ジデオキシ法で調製されたDNAは1本鎖DNAであるが、1本鎖の核酸は分子内で水素結合を介した二次構造を形成することが知られている。二次構造の形成は電気泳動において分子量に依存した正確な分離の妨げとなるが、ポリアクリルアミドゲルに尿素を添加することで二次構造の形成が抑制され、正確な分離が可能となる。ひきつづき電気泳動後のゲルをX線フィルムに接触させることでRIからの放射線を検出するオートラジオグラフィー法により電気泳動パターンを視覚化することができる。得られた電気泳動パターンはハシゴ状のパターンを示し、低分子側から順々に判読することにより最終的に塩基配列が決定できる。

ジデオキシ法を用いることによりDNAシークエンス解析を行うことが可能となったが、この方法はRIを用いてDNAを標識しているために作業者の放射線被爆による健康上の問題や厳格に管理されたRI管理区域内の作業となること、そして作業により放射性廃棄物が発生するなどの様々な問題があり、一般的に広く用いられるためには多くの問題があった。さらに、DNA合成反応の前に鋳型DNAをアルカリ溶液による変性や熱変性を用いることにより1本鎖DNAとする煩雑な操作も必要があった。また、DNA合成反応はプライマーの3'末端から開始されて鋳型DNAの末端まで進行するとDNA合成反応が停止するが、鋳型DNAはDNA合成反応に一度用いられるだけであることもありDNAシークエンス解析に必要な鋳型DNAは約10μgと多く必要となっていた。加えてこれ以外にも電気泳動結果からの塩基配列の判読が作業者の目視によるためにその客観評価が難しく人為的な間違いの起きる危険性が高いことも大きな問題である。

このような多くの問題が従来のジデオキシ法にあるため、現在はこのジデオキシ法を基にして改良されたCS法が広く用いられている。CS法の開発により、DNAシークエンス解析が広く用いられるようになってきた。このCS法の反応過程をFig. 1.5に示す.

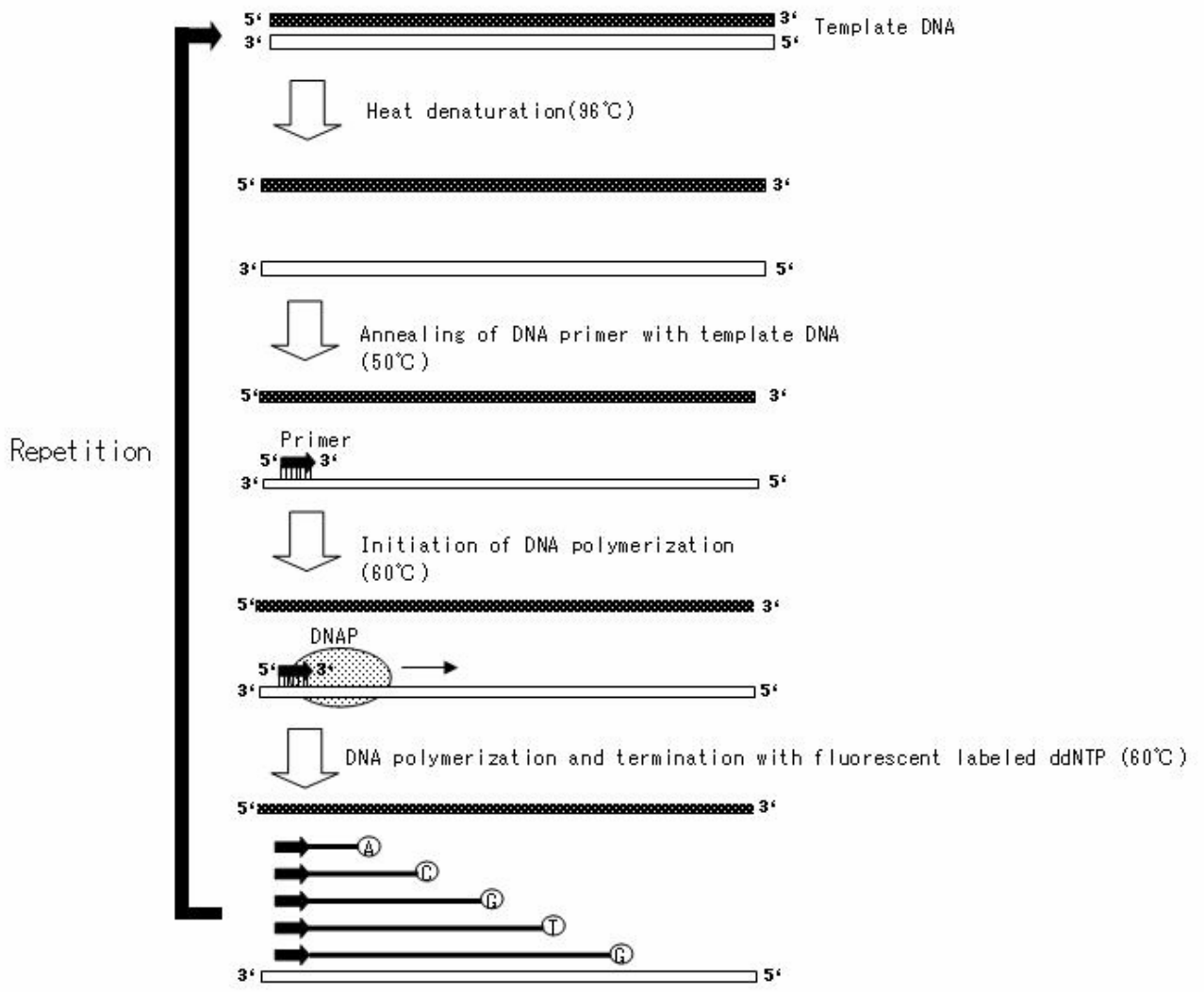

Fig. 1.5 Procedure of Cycle Sequencing.

その特徴は第一に従来のジデオキシ法では至適反応温度が37℃であるKlenow FragmentやT7 DNA polymeraseが用いられていたが、これらのDNAPのかわりに *Thermus aquatics* 由来の耐熱性DNAPである *Taq* DNAPが用いられたことである。耐熱性DNAPを用いることで反応前の鋳型DNAの変性操作が必要なく、1本鎖DNAの調製が反応液中でDNA合成反応と同時に行えるようになったことで、煩雑な反応前処理の必要が無くなった。さらに、サーマルサイクラーと呼ばれる温調機器を用いて反応温度を変化させることで鋳型DNAの1本鎖DNAへの変性だけではなくプライマーの鋳型DNAとの結合（アニーリング)、DNA合成反応の各反応過程を繰り返し行うことでDNA合成反応を連続的に行うことが可能になった。これにより従来のジデオキシ反応では難しかった鋳型DNAのリサイクル、すなわちDNA合成反応に一回使用された鋳型DNAが反応液中で繰り返し使用できるようになった。この繰り返し使用の効果で一回のDNAシークエンス解析に必要なDNAが従来法の場合

と比較して1/10量程度にまで減らすことが可能となり、鋳型調製のコストダウンや作業の省力化に大きく貢献した。第二の特徴としては、DNAの標識を従来法のRI標識されたdNTPを用いる方法から蛍光標識したddNTPを用いたDNA標識法を用いることにより、RI使用における様々なデメリットを解消することができた。CS法ではそれぞれのddNTPを、蛍光波長が異なり蛍光自動シークエンサーにおいて分光可能な蛍光物質により標識することでddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTPをそれぞれ区別して検出することができる[7,8]。これによりRI使用による様々な問題の解消だけでなく後述する蛍光自動シークエンサーを用いることにより作業者の目視による泳動結果の判読から機器およびソフトウェア使用による泳動結果の客観的な判読ができるようになった。蛍光標識したddNTPを取り込んだDNA断片の電気泳動および検出はFig. 1.6に示す蛍光自動シークエンサーによって行うことができ、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離と同時にArレーザー等によるゲル中での蛍光の励起およびCCD素子や光電子増倍管による標識ddNTP由来の蛍光の検出を行い、検出された蛍光シグナルがどの塩基に対応するものかをソフトウェアによる客観的な判別による塩基配列の解読が行える。

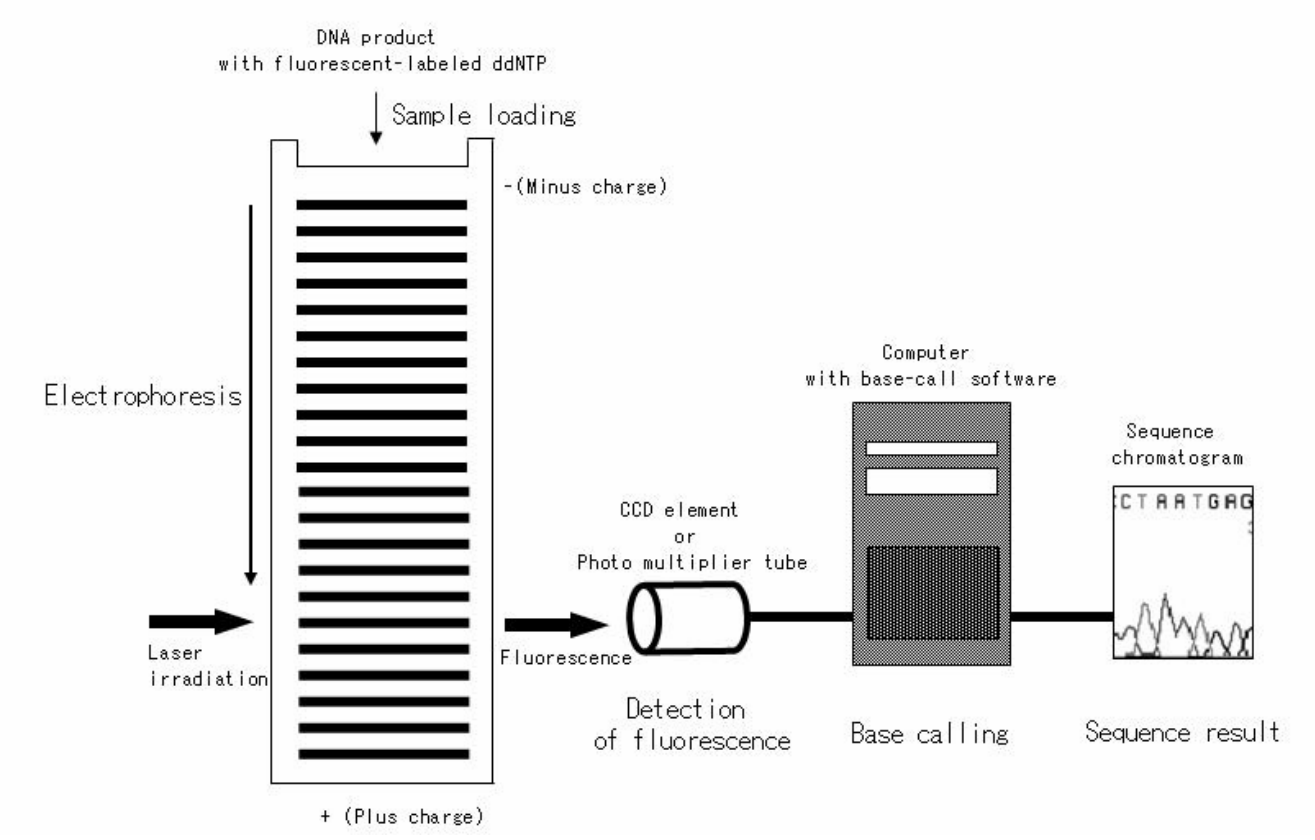

Fig. 1.6 Mechanism of Automated DNA Sequencer.

1.3. CS 法の問題点

CS 法を用いた DNA シークエンス解析は RI による被爆もなく機器を利用した簡便な DNA シークエンス解析法となったことで大規模なゲノム DNA の DNA シークエンス解析プロジェクトなどや臨床分野への応用などが広く進むことになった。しかしながら、CS 法には DNA シークエンス解析を行うにあたり、さらに解決が必要な以下に示すいくつかの問題点があり、その解決が DNA シークエンス解析の使用において極めて重要である。

問題の第一には、現在の DNA シークエンス解析においては解析対象の DNA は目的の DNA 領域が簡便に調製できることから PCR 産物となることが極めて多い。しかしながら PCR 産物の DNA シークエンス解析について CS 法を用いる場合には PCR 産物中の dNTP や PCR プライマーの PCR 産物中からの除去または不活性化処理を CS 法に用いる前に行う必要である。dNTPs と PCR プライマーの除去または酵素反応による不活性化処理が必要な理由は PCR 反応、CS 反応の両方が耐熱性 DNA polymerase による DNA 合成反応に基づいていることによる。PCR 産物中には PCR 産物の増幅反応において未反応のままの dNTP や PCR プライマーが残存しているが、まず残存 dNTP が CS 反応に混入した場合には CS 反応液中の dNTP と ddNTP の相対比の変化をもたらし、ddNTP の相対量が低下することになる。その結果、最終的に得られる蛍光シグナルの低下や蛍光シグナルの不均一となる原因となり、シークエンス解読鎖長が短くなるばかりでなくシークエンス精度も低下し、大きな問題となる。つぎに残存 PCR プライマーが混入した場合には、DNAP による DNA 合成反応は Fig. 1.5 に示すようにプライマーと鋳型 DNA のアニーリング部位から開始されるが一つの CS 反応液中に配列の異なる複数種のプライマーが存在してしまうため、プライマーがアニーリングしている複数の部位から CS 反応が開始されてしまうことになり DNA シークエンス解析不能となってしまう。このような問題があるため、PCR 産物の反応前処理が必要となるが、しかしながらこの操作は処理時間の増加に加え煩雑な操作を伴うだけでなくコスト増の要因となっている。通常、CS 法の場合は反応前に鋳型 DNA となる PCR 産物からゲルろ過法やシリカ膜を用いた精製法により dNTP と PCR プライマーを取り除く方法や alkaline phosphatase と exonuclease I を用いた酵素による dNTP と PCR プライマーの不活性化処理を行う方法などが用いられる[9]。このような反応前操作は極めて煩雑かつ工程の多い操作であり、このことは DNA シークエンス解析の自動解析システムの開発や微細加工技術を用いたデバイス開発などにおける障害ともなっている。

問題の第二には、CS 法で用いている DNAP 自身には 2 本鎖 DNA の 1 本鎖 DNA への解離を触媒するような helicase 様の酵素活性はなく反応温度上昇などの処理が必要となる。また、それぞれの反応は反応温度の変化により連続的に引き起こされているためサーマルサイクラー等の専用機器による反応温度の変化

が必要であるが機器による温度調節を行うことによる時間的ロスが大きく反応時間の大幅な短縮は現状では難しいため現在よりも解析時間の短縮が必要な臨床応用分野での利用においては、なんらかの改善が必要である。

問題の第三には、CS 法を利用して DNA シークエンス解析を行った場合に GC 含量が多い（GC リッチ）DNA 領域やリピート配列などは原理上解読不能となることが多い。CS 法においては Fig. 1.5 に示すように熱変性によって鋳型 DNA を 1 本鎖 DNA とする必要があるが 1 本鎖 DNA は分子内で水素結合を介して高次構造を形成することが知られており、GC リッチな配列の場合には AT 配列の場合と比較して水素結合が多く形成されることに起因する強固な二次構造が形成されるため、解読不能となる。鋳型 DNA である 1 本鎖 DNA に強固な二次構造が形成されると二次構造を形成している領域で DNAP の DNA 合成反応がその領域の直前で停止する。そのために GC リッチな DNA 配列は CS 法での解析は極めて困難とされ、このような問題を解決する目的でこれまでに DNA の水素結合形成を解離させるために dimethyl sulphoxide(DMSO)やヌクレオチドアナログを DNA 合成反応液に添加することによる改善方法が報告されてきたがいずれも解決には不十分であり、これまでの技術ではこの問題を完全に解消することは難しい[10, 11]。

しかし、このような領域は意味のない領域というわけではなく、生物学的あるいは産業面で重要な DNA 領域が含まれていることが明らかにされている。生物学的に重要なものとして遺伝子発現制御を担うプロモーターやエンハンサー領域などが多く存在している CpG island が知られている[12]。CpG island は極めて GC リッチな DNA 領域である。CpG island はまたゲノムインプリンティングなどによる遺伝子発現を制御する領域として知られており[13, 14]、メチル化による 5-methyl cytidine の形成および脱メチル化が遺伝子配列自身の変化を伴わずに遺伝子発現を制御して細胞の発生および分化の過程において重要な働きをする重要な遺伝子領域である。さらに産業面においては、一例として抗生物質などを産生する放線菌においてはゲノム全体が GC リッチな染色体を有しているが、このような有用微生物の遺伝子解析は産業上有用な遺伝子産物の探索や創製においても極めて重要である[15]。

以上に大きな問題点を 3 つに分けて記述したが、CS 法で解読不能な DNA 領域をどのようにして解読するのかは極めて大きな問題である。

1.4. 本博士論文研究の意義

1 章(1.3.)で述べたように CS 法には解決すべきいくつかのの問題がある。1 章(1.3.)に記述したように、CS 法の改良によって対応することも試みられてきたが、現時点では実用的に満足できるような形式での解決には至っていない。換言すれば、CS 法の有するこれらの問題は DNAP をジデオキシ法における DNA

合成反応に用いていることに起因する問題であると考えることができる。したがって、CS 法とは異なる原理を有する新規な DNA シークエンス解析法の開発が求められている。

そこで、本論文においてはジデオキシ法における伸長反応に用いる酵素に新たに RNA polymerase(RNAP)を用いることにより、CS 法の問題点を解決できる新たな DNA シークエンス解析法の開発が可能であると予想した。本論文では、まず *E. coli* ファージである T7 ファージ由来の T7 RNA polymerase（T7 RNAP）を用いた *in vitro* 転写反応をジデオキシ法へ応用することを考えた。T7 RNAP は、T7 プロモーター下流の DNA 配列に相補的な RNA を合成することが可能なため、人工的に試験管内で RNA 合成を行う *in vitro* 転写法において用いられている酵素である[16]。T7 RNAP は、Fig. 1.7 に示すような RNA 合成反応を触媒する DNA 依存的 RNA polymerase（RNAP、EC2.7.7.6）に属し、nucleotide triphosphate(NTP)を基質として取り込みことで鋳型 DNA 配列に相補的な RNA の合成を触媒する酵素である。

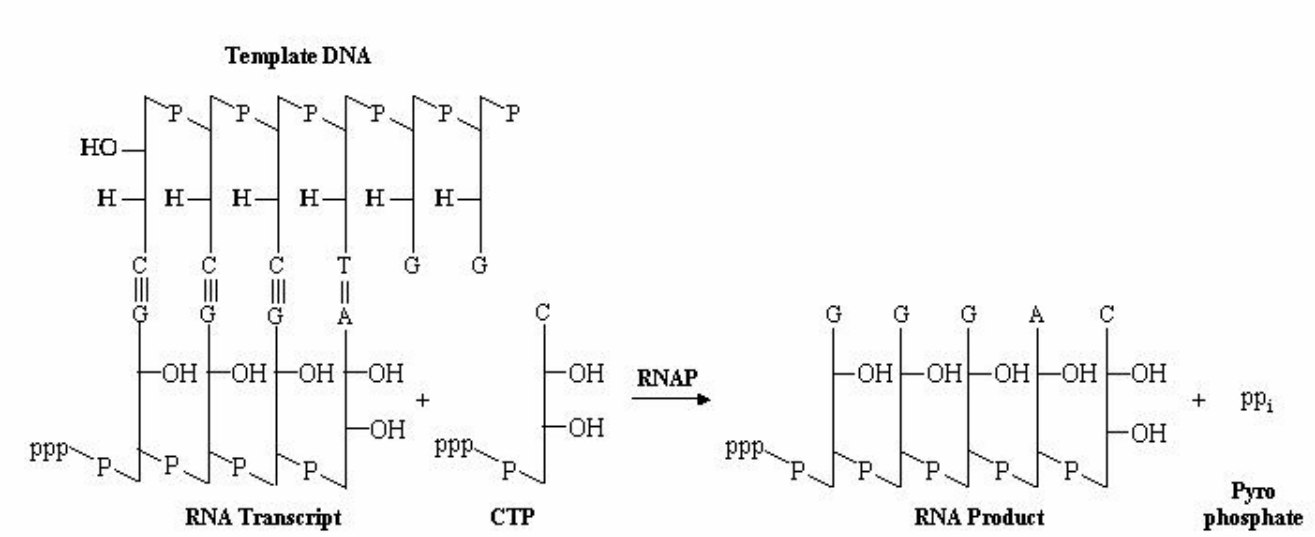

Fig. 1.7 RNAP Reaction.

本論文で用いる T7 RNAP は、全長 882 アミノ酸で RNA 結合ドメインと polymerase ドメインの二つのドメインで構成されている約 100 KDa のタンパク質であるが RNAP の中でも特殊な単量体の酵素であることに特徴の一つがある。単量体であることは酵素精製や安定した実験結果の取得において多量体の酵素と比較して大きな利点があり、このことは最終的な実用段階においても安定的な製品製造やコスト削減などの効果ももたらす。反応の開始において RNAP は DNAP と異なり、最初にプロモーターとよばれる DNA 配列への結合が必要である。T7 RNAP の反応が起きるためには T7 RNAP が認識し結合する 23 bp の DNA 配列

であり、T7 プロモーターが鋳型 DNA 中に存在していることが必要である。

T7 RNAP の polymerase 反応過程と DNAP の polymerase 反応過程の比較について Fig. 1.8 に示す。T7 RNAP は酵素自身に helicase 様の酵素活性を有しているために鋳型 DNA の 1 本鎖 DNA への変性および反応後の巻き戻しも行うことが可能で、反応温度も 37℃の恒温であるため *Taq* DNAP のようなサーマルサイクラーによる温度制御は必要がない。RNA 合成反応後すみやかに鋳型 DNA の巻き戻しも行われることから、反応に使用された鋳型 DNA が同一反応液中で繰り返し鋳型 DNA として機能することができる。さらに T7 RNAP による RNA 合成反応においては鋳型 DNA が 1 本鎖となる領域は T7 RNAP が RNA 合成時に結合する短い領域のみとなることで鋳型 DNA が 1 本鎖 DNA の状態で分子内での二次構造を形成するような DNAP の場合と同様なリスクが極めて少ないため、CS 法では困難であった GC リッチ DNA 領域の DNA シークエンス解析が可能になる。また、T7 RNAP は、$d(GC)_{16}$DNA のような Z 型構造を示す DNA を鋳型 DNA として RNA 合成できるという報告もあり、これも長所である[17]。

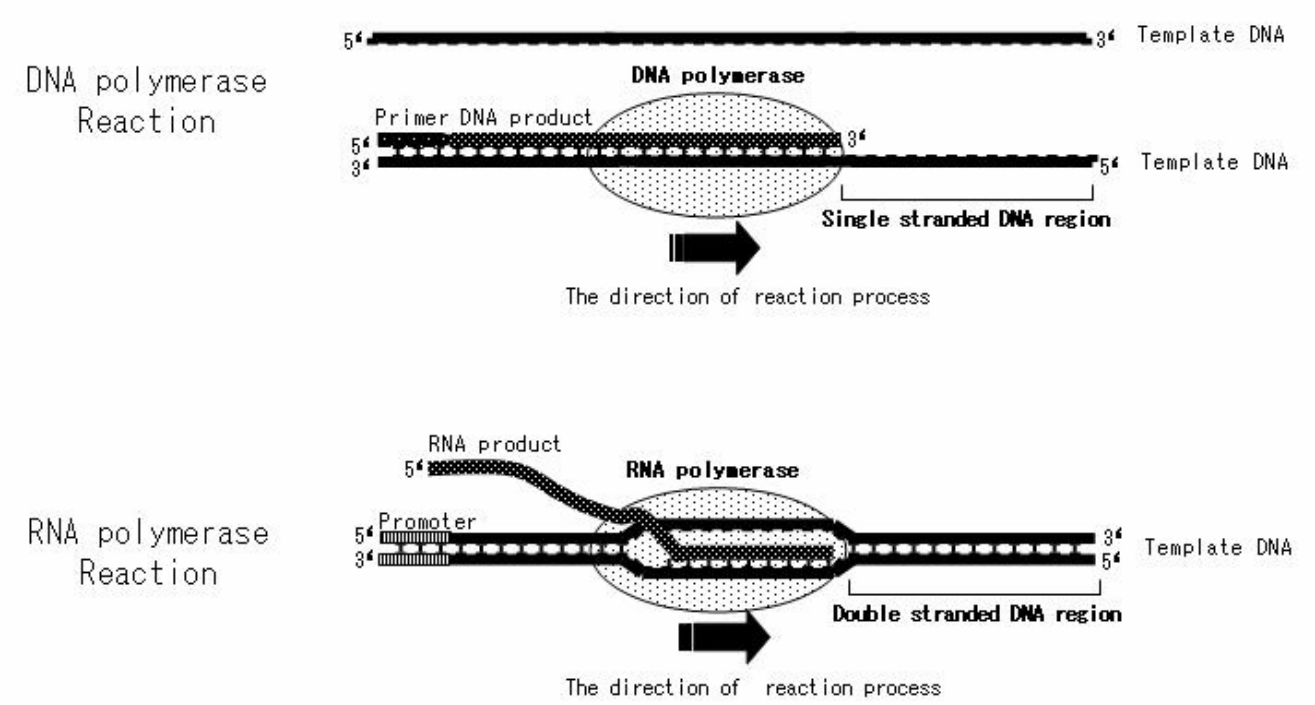

Fig. 1.8 Comparison of DNAP Reaction with DNAP Reaction.

本論文では、以上のような特長を有する T7 RNAP を用いてジデオキシ反応を行うために必要な蛍光標識 3'-deoxynucleoside triphosphate（蛍光ターミネーター）の開発と蛍光ターミネーターの取り込み活性が上昇した T7 RNAP 変異体、これらを利用するために最適な試薬類の開発を行うことで T7 RNAP を用い

たジデオキシ法を開発しCS法の問題点の解消した新規なDNAシークエンス解析法の開発を行った。

参考文献

(1) A.M. Maxam, W. Gilbert, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 560-564(1977).
(2) F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467(1977).
(3) T. Hunkapiller, R.J. Kaiser, B.F. Kopp, L. Hood, Science, 254, 59-67(1991).
(4) International Human Genome Sequencing Consortium, Nature, 409, 860-921(2001).
(5) International Human Genome Sequencing Consortium, Nature, 431, 931-945(2004).
(6) S. Tabor, C. C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4767-4771(1988).
(7) J.M. Prober, G.L. Trainor, R.J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister, Science, 238, 336-341(1987).
(8) L.M. Smith, J. Z. Sander, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent, L. E. Hood, Nature, 321, 674-679(1986).
(9) E. Werle, C. Schneider, M. Renner, M. Völker, W. Fiehn, Nucleic Acids Res., 22, 4354-4355(1994).
(10) D. Seto, J. Seto, P. Deshpande, L. Hood, DNA Seq., 5, 131-140(1995).
(11) M. Motz, S. Paabo, C. Kilger, Biotechniques, 29, 268-270(2000).
(12) I.P. Ioshikhes, M.Q.Zhang, Nature Genet.26, 61-63(2000).
(13) R. Feli, S. khosia, Trends Genet., 15, 431-434(1999).
(14) E. Heard, P. Clerc, P. Avner, Ann. Rev. Genet. 31, 571-610(1997).
(15) H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, S. Omura, Nat. Biotechnol., 26, 526-531(2003).
(16) M. Chamberlin, J. Ring, J. Biol. Chem., 248, 2245-2250(1973).
(17) P. Droge, F. M. Pohl, Nucleic Acids Res., 19, 5301-5306(1991).

第 2 章 研究方法

本章では、研究を進めるに当たって基本になる一般的な実験方法について記述する。なお、特殊な実験方法については各章ごとに記述する。

2.1. 菌株

2.1.1. 供試菌株

遺伝子組換え宿主大腸菌としては、*Escherichia coli* JM109(Nippon gene, Tokyo, Japan)を使用した。

2.2. DNA 調製法および保存法

2.2.1. プラスミド DNA 調製法

プラスミド精製キットを用いた遺伝子組換えプラスミド DNA の調製は、抗生物質 ampicillin を添加した LB 培地[(1)]を用いて 37℃で 18 時間培養した大腸菌から QiAprep Plasmid Mini kit(QIAGEN, Tokyo, Japan)において RNase A を P1 Buffer に添加せず使用することにより、プラスミド DNA を調製した。RNase A の無添加以外の操作法については、製品添付の取扱い説明書に従って、プラスミド DNA の調製を行った。

CsCl 密度勾配超遠心法を用いた遺伝子組換えプラスミド DNA の調製は、ampicillin を添加した LB 培地[(1)]250 ml を三角フラスコに入れ、組換えプラスミド DNA を保持した大腸菌を植菌したのち、37℃で 18 時間培養した。培養後の溶液を培養液用の遠心管に移し、冷却遠心器 himac CR20(Hitachi koki, Tokyo, Japan)を用いて 4,000 X g で 15 分遠心処理することで大腸菌の菌体を沈殿させた。遠心管から上清を除去し、2.5 ml の Sol I 溶液[(1)]を添加して、大腸菌の菌体を懸濁したのち、室温で 10 分間静置した。静置したのちに、10 ml の Sol II 溶液[(1)]を添加して、ゆるやかに攪拌し、氷中で 10 分間静置した。10 分間静置した溶液に 7.5 ml の Sol III 溶液[(1)]を添加して十分に混合したのち、上清を採取した。採取した上清に 0.6 倍量の 2-propanol を添加し、遠心処理することで DNA 沈殿物を得た。得られた DNA 沈殿物に 8.4 ml の TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)を添加して DNA 沈殿物を溶解した。さらに CsCl 9.7 g および ethidium bromide(5 ng/ml)0.84 ml を添加し、CsCl を溶解させたのち、超遠心用の遠心管に移し、専用のシーラーを用いて遠心管の口をシールした。シールした遠心管を超遠心器 himac CP 70 MX(Hitachi koki, Tokyo, Japan)を用いて、400,000 X g で 6 時間遠心することでプラスミド DNA を分離した。遠心後の遠

心管にニードルをさして、プラスミド DNA 画分を分画し、butanol 抽出によって、ethidium bromide(EtBr)を除去した[2]。EtBr 除去後の溶液に等量の TE を添加し、TE 添加後の溶液の 2 倍量の 99.5%(v/v)ethanol を添加することで、ethanol 沈殿を行い、プラスミド DNA を得た。

2.2.2. 宿主大腸菌の凍結保存法

遺伝子組換えプラスミドを導入した大腸菌の保存については、LB 培地に植菌した後に 37℃で 18 時間培養した培養液 300 μl を 1.5 ml 容のスクリューキャップ付きのマイクロチューブに移した後、500 μl の 80%(v/v)の glycerol 溶液を添加して、-80℃で凍結保存した[1]。

2.2.3. DNA の保存法

プラスミド DNA は QiAprep Plasmid Mini kit による溶出液に溶解した状態もしくは TE(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解した状態で、-20℃で凍結保存した[1]。

2.3. DNA 解析法

2.3.1. アガロース電気泳動法

DNA 断片のアガロースゲルを用いた電気泳動は、アガロース電気泳動により確認したい DNA 断片が 1 kb 以上の場合は、1%(w/v)アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、1 kb 未満の場合は、3%(w/v)アガロースゲルを用いて行った[1]。1%(w/v)アガロースゲルの調製には、Agarose S(Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用い、3% アガロースゲルの調製には Agarose 21(Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて、1X TBE(50 mM Tris, 1 mM EDTA, 49 mM borate)に懸濁し、電子レンジで加熱してアガロースを溶解させた。溶解したアガロースに 0.5 μg/ml となるように EtBr を添加し、ゲルトレイ(Advance, Tokyo, Japan)に流し入れ、コーム(Advance, Tokyo, Japan)をセットしたのちに室温に静置して固化させることで、アガロースゲルを作製した。作製したアガロースゲルを 1 X TBE を満たした電気泳動装置 Mupid(Advance, Tokyo, Japan)にセットし、DNA 溶液をサンプルウェルに入れたのち、100V 定電圧で電気泳動を行った[1]。電気泳動後のアガロールゲルは、ゲル撮影装置 Printgraph(Atto, Tokyo, Japan)を用いて紫外線照射状態で撮影し、撮影された結果は感熱紙に印刷した。

2.3.2. Ethanol(EtOH)沈殿法

EtOH 沈殿法は、EtOH 沈殿により回収したい DNA 溶液に、1/20 量の 3 M sodium acetate(pH 5.2)を添加および混合したのちに、2 倍量の 99.5%(v/v) EtOH を添加および混合して、-80℃で 5 分静置した。静置後の DNA 溶液を冷却遠心器 himac CF9RX(Hitachi Koki, Tokyo, Japan)を用いて 18,700 X g で 15 分間遠心し、DNA の沈殿を得た。遠心後に DNA 沈殿物を残して EtOH を除去したのち、つぎに 70% EtOH を添加して、18,700 X g で 5 分間遠心し、そののち EtOH を除去することで DNA 沈殿物を得た[1]。得られた DNA 沈殿物は Centrifuge Concentrator VC-96(TAITEC, Saitama, Japan)で乾燥させたのち、TE に溶解して-20℃で凍結保存した。

2.3.3. PCR 法

PCR 法を用いた PCR 産物の調製については、ExTaq DNA polymerase(Takara bio, Shiga, Japan)を用いて、製品添付の反応バッファーを添加した反応液 20 μl に鋳型 DNA、PCR primer、deoxynucleotide triphosphate(dNTP)、ExTaq DNA polymerase を添加し、サーマルサイクラーを用いて PCR 反応を行った[3, 4, 5]。また、サーマルサイクラーとしては PTC200 DNA Engine(MJ Research, CA, USA)を用いた。PCR 産物を制限酵素で処理する場合には、SUPREC 02(Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて、製品添付の取扱説明書に従って、PCR 産物を精製したのちに TE に溶解した。

2.3.4. 制限酵素による DNA の処理法

制限酵素による DNA の処理については、製品の取扱説明書および製品カタログに基づいて、制限酵素添付の反応バッファーを添加した反応液中に処理したい DNA および制限酵素を添加して、制限酵素による反応を行った[1]。

2.3.5. アガロースゲルからの DNA 抽出法

抽出したい DNA をアガロース電気泳動により分離し、泳動後のアガロースゲルを EtBr により染色したのち、トランスイルミネーター上で紫外線照射することで、DNA バンドを確認した。確認された DNA バンドの中から抽出したい DNA と考えられる DNA バンドをカッターナイフ等で切断し、アガロースゲル片を 1.5 ml 容のマイクロチューブに採取した[2]。採取した DNA を含むアガロースゲル片から、Gene Pure kit(Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて採取した DNA の抽出を行った。抽出した DNA を含む溶液は-20℃で凍結保存した。

2.3.6. DNA の脱リン酸化処理

DNA の脱リン酸化処理については、制限酵素処理によって処理された DNA または合成オリゴヌクレオチドを T4 polynucleotide kinase(Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用い、製品説明書に従って反応液を調製して 37℃で 30 分間の反応を行った。反応したのちに反応液と同量の Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を添加および混合し、冷却遠心器 himac CF9RX を用いて 18,700 X g で 5 分間遠心した。遠心したのちに上清を採取して、別の 1.5 ml 容のマイクロチューブに移した。採取した上清に同量の chloroform を添加して混合したのち、18,700 X g で 5 分間遠心して上清を採取した[1]。採取した上清を別の 1.5 ml 容のマイクロチューブに移し EtOH 沈殿した。EtOH 沈殿によって得られた DNA 沈殿物をすることで脱リン酸化した DNA を得た[1]。得られた DNA 沈殿物は Centrifuge Concentrator VC-96(TAITEC, Saitama, Japan)で乾燥させたのち、TE に溶解して-20℃で凍結保存した。

2.3.7. DNA のライゲーション

DNA のライゲーションは、脱リン酸化処理した DNA を DNA Ligation kit Ver. 2(Takara Bio, Shiga, Japan)を用い、製品説明書に従って反応液を調製した。つぎにライゲーションしたい DNA を反応液に添加して、16℃で 18 時間の反応を行った[1]。反応後の反応液は-20℃で凍結保存した。

2.3.8. DNA の大腸菌への形質転換法

DNA の大腸菌への形質転換は、コンピテントセル 200 μl を 1.5 ml 容のマイクロチューブに移したのち、形質転換したい DNA を添加して、ヒートブロックを用いて 42℃で 90 秒加熱処理した。熱処理後の溶液に 800 μl の SOC 溶液[1]を添加して、37℃で 1 時間振とう培養したのち、スピンダウンし、菌体を回収した。回収した菌体は培養プレートで固化させた LB 寒天培地上にコンラージ棒を用いて、塗布し、37℃で一晩培養した[1]。

2.3.9. 分光光度計を用いた DNA 定量法

分光光度計を用いた DNA の定量は、分光光度計 Gene Quant(Amersham Bioscience, Tokyo, Japan)を用い、機器添付の取扱説明書に従って定量したい DNA 溶液を測定用のキュベットに入れ、吸光度を測定した。測定した吸光度の値に基づいて DNA 量を算出した[1, 6]。

2.3.10. DNA シークエンス解析法

T7 RNAP 変異遺伝子構築において、T7 RNAP 遺伝子を含む PCR 産物の CS 法を用いた DNA シークエンス解析は、Big Dye Terminator Cycle sequencing kit または ABI Prism Taq dye terminator cycle sequencing FS kit(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)を用いて、それぞれの製品に添付の取扱説明書に従って、DNA シークエンス反応および精製を行った。精製産物を ABI Prism 377 DNA sequencer(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)において解析する場合には、ABI Prism 377 DNA Sequencer 取扱説明書に従って調製した loading buffer に溶解し、ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) において解析する場合には、Template Suppression Reagent(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)に溶解した。溶解した反応産物の泳動および DNA シークエンス結果の解析はそれぞれの DNA シークエンサーの取扱説明書に従って泳動および泳動結果の解析を行った。DNA シークエンサーで用いたシークエンスゲルにおいては、ABI Prism 377 DNA sequencer については、機器添付の取扱説明書に従ってゲル溶液を調製し、ABI Prism 377 DNA sequencer 専用のシークエンスゲル調製用のガラス板の間に充填およびシークエンスゲルの重合反応を行うことでシークエンスゲルを調製した[2]。ABI Prism 310 Genetic Analyzer については、流動ゲルである POP6(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)を機器添付の取扱説明書に従って装填した。キャピラリーガラスへの充填は機器によって、自動で行った。

参考文献

(1) T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
(2) 豊島久眞男、山本雅監修、新 細胞工学実験プロトコール、秀潤社(1993)
(3) M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, PCR Strategies, Academic Press (1995).
(4) 藤永薫編、遺伝子増幅 PCR 法、共立出版 (1994).
(5) W. M. Barnes,, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 15, 2216-2220(1994).
(6) 泉美治、中川八郎、三輪谷俊夫編、生物化学実験のてびき 3 核酸の分離・分析法、化学同人、14(1990).

第3章　T7 RNAPの基質として認識可能な蛍光ターミネーターの開発

3.1. 緒言

TS法の構築にあたっては、ジデオキシ法におけるddNTPと同様の性能を示し、T7 RNAPが基質として取り込むことが可能な蛍光ターミネーターの構築が必要とされた。蛍光ターミネーターは、T7 RNAPの基質として認識され、RNA鎖に取り込まれた場合に反応停止を引き起こす。反応停止により得られたRNA産物は3'末端に蛍光ターミネーターが取り込まれた形となっており、このためRNA産物は蛍光で標識されることになる。

本章では、TS法の構築に必要な蛍光ターミネーターの開発を行った。すなわち、TS法においてRNA合成反応の停止およびRNA産物の蛍光標識を行うために必要な蛍光ターミネーターの構築を試み、T7 RNAPを用いた*in vitro*転写法により、蛍光ターミネーターの基質としての取り込みの効率について検討した。さらに、蛍光ターミネーターを添加して合成したRNA産物のDNAシークエンサーを用いた解析において、RNA産物由来のシークエンスシグナルが検出され、分子量ごとに分離されたシークエンスパターンが得られるかについて検討した。これらの検討結果を基盤として、TS法の構築に必要な蛍光ターミネーターとしてR110-$(CH_2)_4$-3'-dGTP(Dye-G)、R6G-$(CH_2)_4$-3'-dATP(Dye-A)、TMR-$(CH_2)_4$-3'-dUTP(Dye-U)、ROX-$(CH_2)_4$-3'-dCTP(Dye-C)を最適なものとして選択することとした。

3.2. 実験方法

3.2.1. 蛍光ターミネーターの構築

蛍光ターミネーターの構築にあたっては、Prober[1]らの方法に従って蛍光体6-carboxy tetramethyl rhodamine(TMR)、6-carboxy X-rhodamine(ROX)、5-carboxy rhodamine6(R6G)、5-carboxy rhodamine110(R110)のN-Hydroxysucci-nimidyl ester(Molecular Probe, OR, U.S.A.)を3'-dUTP、3'-dCTP、3'-dATP、3'-dGTPに付加してすることによって、蛍光ターミネーターTMR-3'-dUTP(Dye-U)、ROX-3'-dCTP(Dye-C)、R6G-3'-dATP(Dye-A), R110-3'-dGTP(Dye-G)を合成した。各試薬の合成に当たっては、7-deaza-3'-dATP、7-deaza-3'-dGTP有するpurin塩基の7位および3'-dCTP、3'-dUTPの有するpyrimidine塩基の5位にリンカー[-C≡C-$(CH_2)_n$-NH-]を導入したのち、N, N-dimethyl formamide水溶液に混合し、triethylamineおよびrhodamine色素のN-Hydroxysuccinimidyl esterを添加して、室温で一晩攪拌することでrhodamine色素のcarboxyl基と

リンカー中の amino 基を結合させた。つぎに、攪拌後の溶液から DEAE イオン交換カラム(Tosoh, Tokyo, Japan)を用いて精製し、蛍光ターミネーター Dye-U、Dye-C、Dye-A, Dye-G を得た。

3.2.2. T7 RNAP による蛍光ターミネーターの取り込み実験

T7 RNAP による蛍光ターミネーターの取り込みの評価実験は以下の反応条件を用いて行った。反応液として 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2 mM spermidine$(HCl)_3$, 250 μM ATP, 500 μM GTP, 200 μM CTP, 500 μM UTP を含む反応液に鋳型 DNA として制限酵素 *Pvu* II で切断した pBluescript SK(Stratagene, CA, U.S.A.) 200 ng を添加した。この反応液に 25 units 野生型 T7 RNAP(Invitrogen, Tokyo, Japan)と Dye-A を添加して、37℃で 1 時間反応した。Dye-A は終濃度 100μM、50 μM、25 μM、10 μM、5 μM となるように反応液に添加した。反応後の反応液から Sephadex G50 column(Amersham Biosciences, Tokyo, Japan)を用いてゲルろ過を行うことで RNA 産物を精製し、精製した RNA 合成産物は Centrifuge Concentrator VC-96 (TAITEC, Saitama, Japan) によって蒸発乾固した。乾燥した RNA 合成産物を ABI Prism 377 DNA Sequencer(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)の取扱説明書に従って調製した loading buffer 6 μl に溶解し、そのうち 2 μl を 90℃で 3 分間熱処理した。熱処理後の溶液は ABI Prism 377 DNA Sequencer で泳動し、取扱説明書に従って泳動結果を解析した。泳動したのちに残った RNA 溶液 4 μl は、-20℃で保存した。

3.3. 実験結果

3.3.1. 蛍光ターミネーターの構築

本論文は、T7 RNAP を用いた新しい DNA シークエンス解析法である Transcriptional Sequencing (TS)法を開発することを目的としている。TS 法の原理は Fig. 3.1 に示しているが、TS 法では 1 章 Fig. 1.1 に示すジデオキシ法における DNA 伸長と ddNTP 取り込みによる DNA 伸長反応の停止に相当する反応を T7 RNAP による RNA 合成反応を用いて行うことが必要となる。このためには、T7 RNAP の基質とするために ddNTP のリボースの 2'位が -OH 基となる 3'-dNTP を用いることが必要であり、さらに CS 法と同様に DNA シークエンサーを用いて検出するためには 3'-dNTP を蛍光体によって標識した蛍光ターミネーターの構築が必要である。

以上のような背景から、本章では T7 RNAP により基質として取り込まれ、DNA シークエンサーを用いた解析によって、シークエンスシグナルの検出を可能と

する蛍光ターミネーターの構築を試み、その評価を行った。

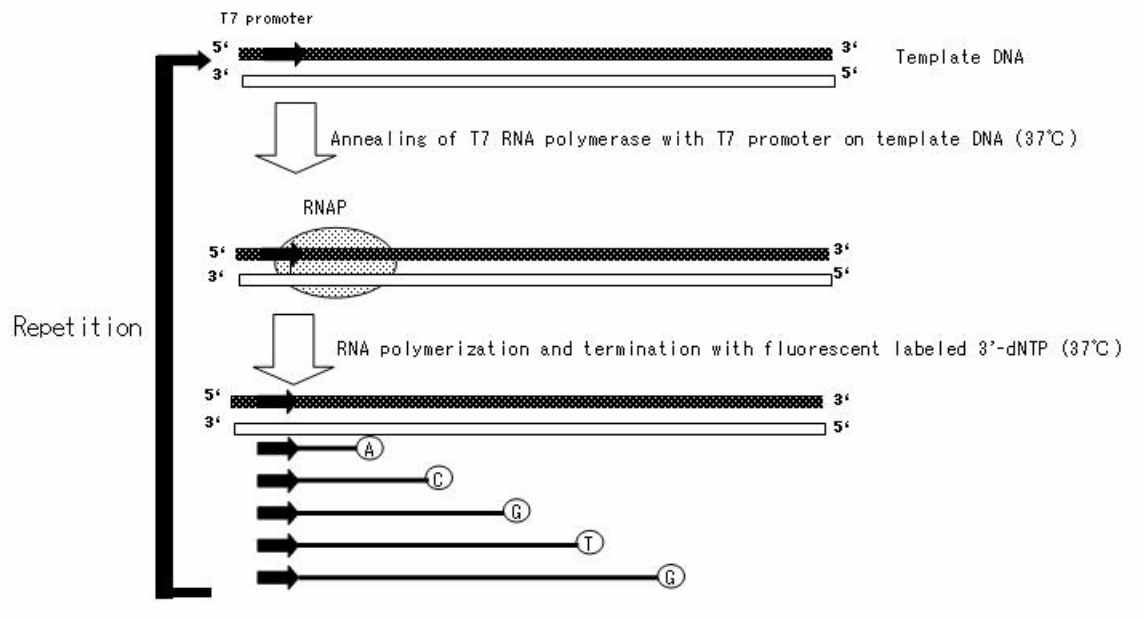

Fig. 3.1 Procedure of Transcriptional Sequencing

Fig. 3.2 に、本章において構築した蛍光ターミネーターである Dye-U、Dye-C、Dye-A、Dye-G の構造を示す。蛍光ターミネーターの構築に用いる蛍光体は、DNA シークエンサーに搭載されている 536 nm、559 nm、586 nm、615 nm の分光フィルターで分光可能であり、DNA シークエンサーに搭載されている 488 nm および 514 nm の波長を放出する Ar レーザーにより励起可能と考えられる[(2)]蛍光体 R110、R6G、TMR、ROX を 3'-dNTP の標識に用いて蛍光ターミネーターを構築した。

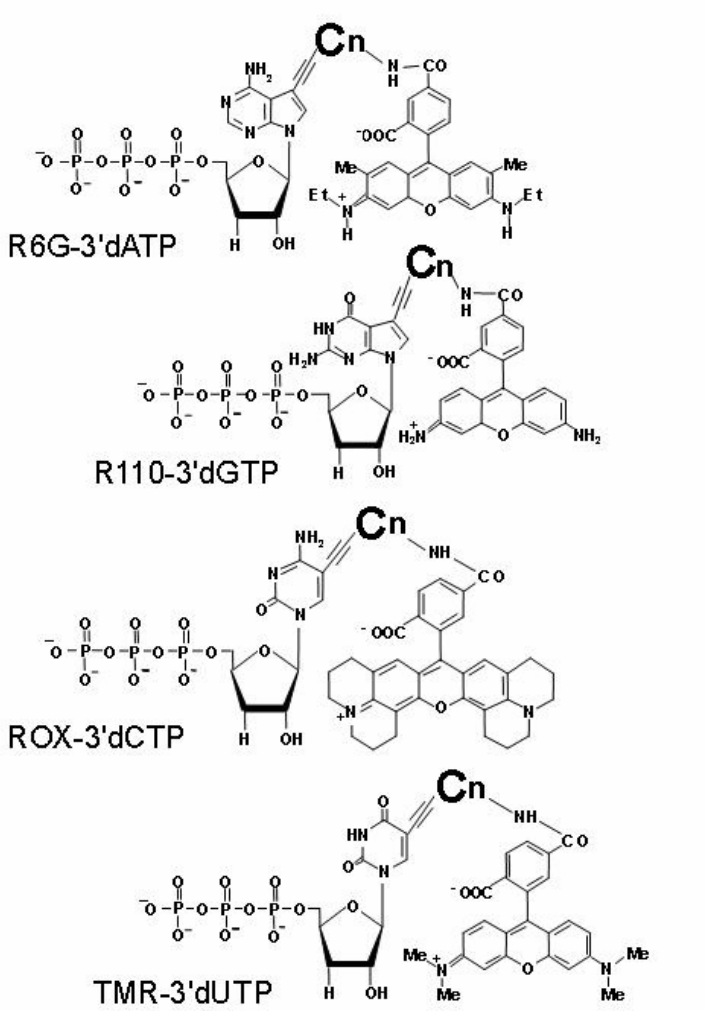

Fig. 3.2 Structure of four rhodamine-labeled 3'-dNTPs.
Cn indicates the number of CH_2 chain in the linker between rhodamine dye and base of 3'-dNTP.

3.3.2. T7 RNAP による蛍光ターミネーターの取り込みの評価

つぎに、構築した蛍光ターミネーターを T7 RNAP を用いた RNA 合成反応に添加した場合の T7 RNAP による取り込み、およびシークエンスシグナルの検出について検討を行った。T7 RNAP を用いた RNA 合成反応に蛍光ターミネーターを添加し、T7 RNAP により基質として取り込まれた場合には、RNA 合成反応は停止し、その結果得られた RNA 産物の 3'末端は蛍光ターミネーターにより蛍光標識されることになる。蛍光標識された RNA 産物を DNA シークエンサーで解析することによりシークエンスシグナルが得られることになる。実際に 4 種の蛍光ターミネーターDye-U、Dye-C、Dye-A、Dye-G を T7 RNAP による RNA 合成反応に添加し、合成された RNA 産物を DNA シークエンサーで解析したところ、Dye-U および Dye-G では分子量毎に分離したシークエンスシグナルが検出された。しか

し、Dye-A および Dye-C ではシークエンスシグナルは検出されなかった（データ省略）。以上の結果において、Dye-A および Dye-C を添加した場合にシークエンスシグナルが検出出来なかった原因として、以下に示す知見から、T7 RNAP による蛍光ターミネーターの基質としての取り込みの際に蛍光物質に起因する立体障害が関与していると推測した。まず、蛍光標識していない 3'-dNTP および[α-^{32}P]UTP の共存下で T7 RNAP による RNA 合成反応を行ったところ、RI 標識されたシークエンスラダーが確認された。この結果から 3'-dNTP は T7 RNAP の基質となることを示している。つぎに Dye-C については、蛍光体である ROX と 3'-dCTP との組み合わせ以外に TMR、R6G および R110 により標識した TMR-3'-dCTP、R6G-3'-dCTP および R110-3'-dCTP を構築し、T7 RNAP による RNA 合成反応に添加した場合でも、シークエンスシグナルは検出されなかった。この結果はシークエンスシグナルが得られなかった原因が蛍光体の種類によるものではないことを示唆した。以上のような実験結果に基づき、Dye-A および Dye-C でシークエンスシグナルが検出されなかった原因は、蛍光物質と 3'-dNTP 種の組み合わせに起因する問題ではなく、T7 RNAP による蛍光ターミネーターの取り込みの際に蛍光物質に起因する何らかの立体障害が生じ、T7 RNAP が蛍光ターミネーターを取り込めないのではないかと推測した。

そこで、この立体障害の解消を目的に、蛍光ターミネーターにおいて T7 RNAP に取り込まれるリボースおよび塩基部分と T7 RNAP との相互作用の必要がない蛍光体をつなぐリンカーの鎖長を長くすることで、立体障害の解消を試みた。具体的には、Fig. 3.2 に示す蛍光ターミネーターの構造において蛍光体と塩基間に存在するメチレン鎖$(CH_2)_n$のリンカー鎖長を、最初に構築した n=1 から n=4 に変更した蛍光ターミネーターを構築した。つぎにこのリンカー鎖長を延長した蛍光ターミネーターを T7 RNAP による RNA 合成反応に添加し、DNA シークエンサーで RNA 合成産物を解析することでシークエンスシグナルが得られるかについて検討を行った。

Fig. 3.3 に示す実験は制限酵素 *Pvu* II で切断した pBluescript SK プラスミド DNA を鋳型 DNA として用い、リンカー鎖長の異なる Dye-A を野生型 T7 RNAP を用いた RNA 合成反応に添加して得られた RNA 産物の DNA シークエンサーでの解析結果を示している。Fig. 3.3 に示す実験結果において、リンカー鎖長が n=1 である Dye-A を RNA 合成反応に添加した場合、終濃度 100 μM から 5 μM となるように添加したすべての反応条件において、シークエンスシグナルを得ることが出来なかった。一方、リンカー鎖長が n=4 である Dye-A を用いた場合には、終濃度 100 μM から 5 μM となるように添加したすべての反応条件において、シークエンスシグナルを得ることが出来た。また、終濃度 10 μM および 5 μM でリンカー鎖長 n=4 の Dye-A を添加した場合には低分子領域から高分子領域に渡ってシークエンスシグナルが得られることが明らかになった。しかしながら、終濃度 100 μM から 25 μM の反応条件では高分子領域に至る前にシークエンス

シグナルが減衰しており、この結果は、この検討実験に用いたRNA合成反応条件において、Dye-A量が多くなることにより、伸長反応よりも蛍光ターミネーターを取り込みによる停止反応が優先的に起こったため、低分子領域で停止したRNA産物が多いことを示している。

以上のようにn=1のリンカーを有するDye-Aを用いた場合には認められなかったシークエンスシグナルがリンカー鎖の延長により検出出来ることが明らかとなったが、リンカー鎖の延長による同様の効果はDye-Cにおいてもリンカー鎖長をn=4とすることで同様に認められ、シークエンスシグナルが検出された（データ省略）。以上の結果によりn=1のリンカーを有する蛍光ターミネーターを用いた場合にシークエンスシグナルが検出出来なかったDye-CおよびDye-Aについて、リンカー鎖長をn=4とすることでシークエンスシグナルの検出が可能であることが明らかとなった。これとは別にn=4のリンカーを有するDye-GおよびDye-Uを用いた場合は、n=1の場合と同様にシークエンスシグナルを得ることが可能であった。

本章における検討結果に基づいて、TS法の構築にあたっては蛍光ターミネーターのリンカー鎖長がn=4であるDye-U(n=4)、Dye-C(n=4)、Dye-A(n=4)、Dye-G(n=4)を用いることとした。

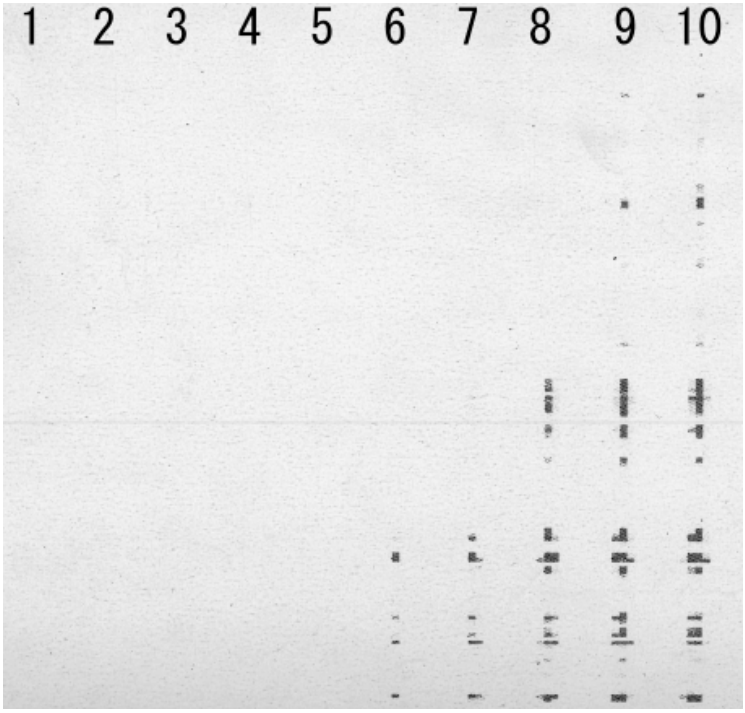

Fig. 3.3 Effects of linker length on the termination patterns with R6G-3'-dATP.
$(CH_2)_1$ and $(CH_2)_4$ linker for R6G-3'-dATP were tested. Each lane had R6G-$(CH_2)_1$-3'-dATP and R6G-$(CH_2)_4$-3'-dATP (lane 1-5 and 6-10, respectively). R6G-3'-dATP concentrations in lanes 1 and 6, 100 μM; lanes 2 and 7, 50 μM; lanes 3 and 8, 25 μM; lanes 4 and 9, 10 μM; lanes 5 and 10, 5 μM.

3.4. 考察

本章では、TS 法を行うために必要である蛍光ターミネーターの構築をった。3'-dNTP と蛍光体の間のリンカー鎖長を n=1 から n=4 へ変更することによって T7 RNAP により基質として取り込まれ、蛍光ターミネーターにより蛍光標識されることで、シークエンスシグナルが得られることが明らかとなった。しかし、リンカー鎖長については n=1 および n=4 以外の場合において、n=6 のリンカーを用いた際にも n=4 を用いた場合と同様の効果が認められた。しかしながら n=3 のリンカーを用いた場合では n=1 の場合と同様にシークエンスシグナルが検出されなかった（データ省略）。この結果から、リンカー鎖長が短い場合には蛍光体に起因する立体障害の影響が大きく、n=4 以上になった場合に、この問題が解消されることが明らかとなった。このようなリンカー鎖の延長による同様の効果は、ジデオキシ法に関する報告ではないが、PCR 法を用いた蛍光標識 DNA プローブの調製法において、標識ヌクレオチドとして Cy3-dUTP を用いた場合に

蛍光体 Cy3 と塩基間のリンカー鎖の延長により PCR 産物由来の蛍光シグナル強度が上昇することが報告されている[3]。

以上の知見は、DNAP や RNAP を用いた効率の良い核酸蛍光標識法の構築において有用なものと考えられる。

3.5. 結語

本章では、T7 RNAP の基質として認識可能な蛍光ターミネーターの開発を行った。蛍光ターミネーターは、T7 RNAP の基質として認識され、RNA 鎖に取り込まれた場合、DNAP の場合の ddNTP と同様に、反応終結を引き起こすものである。蛍光ターミネーターとして 4 種の蛍光体 TMR、ROX、R6G、R110 を 3'-dUTP、3'-dCTP、3'-dATP、3'-dGTP にそれぞれ付加することにより蛍光ターミネーター Dye-U、Dye-C、Dye-A、 Dye-G の構築を行った。

つぎに構築した蛍光ターミネーターが、T7 RNAP の基質となり得るのかについて、T7 RNAP を用いた *in vitro* 転写反応へ蛍光ターミネーターを添加し、RNA 産物由来のシークエンスシグナルの検出を指標に検討を行った。その結果、Dye-U および Dye-G では、分子量毎に分離したシークエンスシグナルが検出されたが、Dye-A および Dye-C では検出されなかった。シークエンスシグナルが検出できない原因として、本章における検討結果から、蛍光ターミネーターの有する蛍光物質に起因する何らかの立体障害によって T7 RNAP による蛍光ターミネーターの取り込みの阻害が起こったことを示唆した。そこで、この問題の解消を目的に 3'-dNTP と蛍光物質間のリンカー鎖長を n=1 から n=4 に変更したところ、リンカー鎖長 n=4 の Dye-A および Dye-C の両者に、分離したシークエンスシグナルが検出された。

以上より、TS 法に適した蛍光ターミネーターこれらの検討結果を基盤として以上より、TS 法の構築に必要な蛍光ターミネーターとして R110-$(CH_2)_4$-3'-dGTP (Dye-G)、R6G-$(CH_2)_4$-3'-dATP(Dye-A)、TMR-$(CH_2)_4$-3'-dUTP(Dye-U)、ROX-$(CH_2)_4$-3'-dCTP(Dye-C)を最適なものとして選択し、TS 法に必用とされる蛍光ターミネーターの開発に成功した。

参考文献

(1) J. M. Prober, G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister, Science, 238, 336-341(1987).

(2) L. G. Lee, S. L. Spurgeon, C. R. Heiner, S. C. Benson, B. B. Rosenblum, S. M. Menchen, R. J. Graham, A. Constantinescu, K. G. Upadhya, J. M. Cassel, Nucleic Acids Res., 25, 2816-2822(1997).

(3) Z. Zhu, J. Chao, H. Yu, A. S. Waggoner, Nucleic Acids Res., 22, 3418-3422(1994).

第 4 章　蛍光ターミネーターの取り込みの改善した T7 RNAP 変異体の構築

4.1. 緒言

第 3 章における検討において、野生型 T7 RNAP および蛍光ターミネーターを用いて調製した RNA 産物由来のシークエンスシグナルが弱いことに起因すると考えられるシークエンスエラーの問題が明らかとなった。この問題の原因として T7 RNAP の 3'-dNTP と NTP に対する基質特異性の違いにより、NTP と比較して効率よく蛍光ターミネーターが T7 RNAP に取り込まれていないことが推測された。

本章においては、T7 RNAP による蛍光ターミネーターの取り込みの改善を行うことにより、シークエンスシグナルの上昇によりシークエンスエラーを解消することが可能と考え、NTP と 3'-dNTP の基質特異性に関与している T7 RNAP のアミノ酸部位を探索して改良を加えることとした。とくに、NTP と 3'-dNTP の構造の相違点であるリボースの 3'位の-OH 基との相互作用に関与する T7 RNAP のアミノ酸残基を探索して、検討を加えた。すなわち、この部位への変異導入を行うことにより 3'-OH 基に対する基質特異性を変化させ、3'-dNTP の取り込みが改善された T7 RNAP 変異体を構築できればシークエンスエラーの問題の解消が可能であると考えたためである。以上より、T7 RNAP における 3'-OH 基との相互作用部位の探索および T7 RNAP 変異体の構築を行うとともに、その評価を行った。

4.2. 実験方法

4.2.1. T7 RNAP タンパク質発現ベクターの構築

T7 RNAP 遺伝子を単離する目的で、まず Studier[(1)]の方法に基づいて T7 ファージゲノム DNA を以下の方法で調製した。具体的には T7 ファージ(National Institute of Genetics, Mishima, Japan)を感染させた大腸菌 C600 の菌体を遠心処理することで残査を取り除き、終濃度 0.5 M NaCl および 10% glycerol となるように NaCl および glycerol を添加して沈殿を形成させる。形成した沈殿を遠心処理することにより得た沈殿物を SM バッファー(10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 0.01%(w/v) NaCl, 0.01%(w/v) gelatin)にて懸濁させた。懸濁溶液を CsCl 密度勾配遠心法により遠心処理することで、T7 ファージ粒子の濃縮層が形成できる。形成した T7 ファージ粒子の濃縮層は分取したのちに TE バッファー(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA)で透析した。透析後の T7 ファージ粒子はフェノール抽出をすることで T7 ファージ由来のタンパク質

を除去し、T7 ファージゲノム DNA を含む抽出液をイソプロパノール沈殿することで T7 ファージゲノム DNA を精製した。精製した T7 ファージゲノム DNA は TE バッファーに溶解して-20℃で保存した。

つぎに、T7 RNAP 遺伝子の全長領域を単離する目的で、0.6 M PCR プライマー T7Rpol-N(5'-ATA,TTT,TAG,CCA,TGG,AGG,ATT,GAT,ATA,TGA,ACA,CGA,TTA,ACA,TCG,CTA,AG-3')と T7Rpol-C(5'-ATA,TTT,TAG,CCA,TGG,TAT,AGT,GAG,TCG,TAT,TGA,TTT,GGC,G-3')を用い、を添加し、T7 ファージゲノム DNA を鋳型 DNA 100 ng および Ex Taq DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan)を添加して PCR 反応を行うことにより、T7 RNAP 遺伝子の全長領域をコードする PCR 産物を調製した。PCR 法に用いるサーマルサイクラーとしては PTC-200 DNA Engine(MJ Research, CA , U.S.A)を使用した。PCR 反応プログラムは 94℃で 1 分間の予備変性処理後、94℃で 30 秒、55℃で 45 秒、72℃で 2 分の増幅反応を 30 回繰り返したのちに 72℃で 5 分の後処理を行った。得られた PCR 産物は、Dye Terminator FS Cycle Sequencing kit および ABI Prism 377 DNA sequencer(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)により DNA シークエンス解析を行うことで PCR による変異塩基の導入がないことを確認した。さらに、制限酵素 *Nco*I により切断して、アガロースゲルによる電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルから DNA 断片を切り出したのちに Gene Pure Kit(Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて抽出し、制限酵素 *Nco*I で切断したタンパク質発現用ベクター pTrc99A(Amersham Bioscience, Tokyo, Japan)とライゲーションすることで T7 RNAP 発現ベクター pT7R を構築した。

4.2.2. T7 RNAP 変異体の構築および T7 RNAP タンパク質の精製

T7 RNAP 変異体の構築および T7 RNAP タンパク質の精製は、以下の方法で行った。最初に T7 RNAP 変異体遺伝子を構築する際のクローニング部位として利用するために T7 RNAP 遺伝子上にない制限酵素切断部位である *Xho*I 切断部位を以下の工程で pT7R に導入した。具体的には、まず 0.6 μM PCR プライマー *Apa*FI (5'-CAT,CTG,GTC,GCA,TTG,GGT,CAC-3')と PCR プライマー *Xho*-R(5'-CCA,AGT,GTT,CTC,GAG,TGG,AGA-3')の組み合わせおよび PCR プライマー *Xho*-F(5'-CTA,AGT,CTC,CAC,TCG,AGA,ACA,CTT,GG-3')と PCR プライマー *Afl* III-R(5'-CAG,CCA,GCA,GCT,TAG,CAG,CAG-3')の組み合わせで、鋳型 DNA として pT7R 100 pg および 2.5 units ExTaq DNA polymerase(Takara Bio, Shiga, Japan)を添加して PCR 反応を行うことにより PCR 産物を調製した。PCR 法に用いるサーマルサイクラーとしては PTC-200 DNA Engine(MJ Research, CA , U.S.A)を使用した。PCR 反応プログラムは 94℃で 1 分間の予備変性処理後、94℃で 30 秒、55℃で 45 秒、72℃で 3.5 分の増幅反応を 30 回繰り返したのちに 72℃で 5 分の後処理を行った。前者の PCR プライマーの組み合わせから得られた PCR 産物は制限酵素 *Apa*I と

*Xho*Iで切断し、後者は制限酵素 *Afl*IIIと *Xho*Iで切断した。さらにT7 RNAP発現ベクターDNAを制限酵素 *Apa*Iと *Afl*IIIで切断して、これらの3つのDNA断片を連結することでpT7RのT7 RNAP遺伝子上に *Xho*I切断部位を導入した。

T7 RNAP遺伝子への点変異の導入は、Horton[2]らのPCR法を用いた点変異導入法に従い、点変異を導入したT7 RNAP遺伝子を有するPCRプライマーを用いて点変異の導入を行った。点変異の導入で用いたPCR反応は0.6 μMの各PCRプライマーおよび2.5 units ExTaq DNA polymeraseを用いて行った。PCR法に用いるサーマルサイクラーとしてはPTC-200 DNA Engine(MJ Research, CA, U.S.A)を使用した。PCR反応プログラムは94℃で1分間の予備変性処理後、94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分の増幅反応を30回繰り返したのちに72℃で5分の後処理を行ったT7 RNAP変異遺伝子を有するPCR産物はDye Terminator FS Cycle Sequencing kitおよびABI Prism 377 DNA sequencerによりDNAシークエンス解析を行うことでPCRによる変異塩基の導入がないことを確認した。得られたDNA断片のうちF644Y、F646Yをコードする変異遺伝子を含むDNA断片は制限酵素 *Hpa*Iおよび *Pst*Iで切断し、F667Y、F733Y、F782Yをコードする変異遺伝子を含むDNA断片は制限酵素 *Xho*Iおよび *Afl*IIで切断した。F882Yをコードする変異体遺伝子を含むDNA断片については制限酵素 *Kpn*Iで切断した。制限酵素で切断した各DNA断片はアガロース電気泳動およびアガロースゲルから抽出し、pT7R DNAを上記の制限酵素の組み合わせで切断後、同様にアガロースゲルからの抽出を行った。抽出した変異遺伝子DNA断片とpT7R DNAをライゲーションすることでT7 RNAP変異体タンパク質発現ベクターを構築した。

T7 RNAPタンパク質の発現および精製は、構築したT7 RNAP発現ベクターを大腸菌DH5αに導入し、Chamberlin[3]らおよびZawadzki[4]らの方法に基づいて以下の方法によって行った。まずT7 RNAPタンパク質発現ベクターを導入した大腸菌DH5αを抗生物質ampicillinを含むLB培地に植菌して、OD_{600}が0.4から0.6になったところでisopropyl-β-D-thiogalactoside(IPTG)を終濃度0.4 mMになるように添加して8時間培養した。培養後の菌体を遠心処理により集菌して、菌体の10倍量の20 mM Tris-HCl pH 8.1, 130 mM NaCl, 2 mM EDTAを含むWash Bufferを添加して懸濁した。さらに、再び遠心処理した後に上清を除去し、菌体の10倍量の50 mM Tris-HCl pH 8.1, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1 mM benzamine, 30 μg/ml phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF), 10 μg/ml bacitracinを含むsonication bufferを用いて、菌体を懸濁した。懸濁溶液はSonifier 450(Branson, CT, U.S.A)を用いて、超音波処理したのちに硫酸アンモニウム沈殿によりT7 RNAPタンパク質の含まれる画分を分画した。T7 RNAP画分をHaparin-SepharoseおよびQ-Sepharose(Amersham Bioscience, Tokyo, Japan)に充層して0.1 Mから0.64 MのNaCl濃度勾配を与えた条件下で、T7 RNAPタンパク質を溶出した。溶出画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することによりT7 RNAPに相当する約100 kDaのバンドを確認したの

ちに、50%(w/v) glycerol, 20 mM KH_2PO_4 pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 30 μg/ml PMSF を含む storage buffer に対して 16 時間透析し -20℃にて保存した。

4.2.3. T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の polymerase 活性の比較

T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の polymerase 活性の比較実験は以下の反応条件を用いて行った。反応液としては、40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 200 μM GMP, 250 μM ATP, 250 μM GTP, 250 μM CTP, 250 μM UTP, 0.2 μCi [α-^{32}P] UTP を調製し、鋳型 DNA として pBluescript SK（Stratagene, CA, U.S.A.）を制限酵素 *Pvu*II により処理した DNA 20 ng および T7 RNAP 変異体または野生型 T7 RNAP 酵素標品を 1 μg 添加し、37℃で 15 分反応を行った。反応によって得られた RNA 合成産物は Sousa[7]らおよび Bonner[12]らの方法に従って RNA 合成産物をトリクロロ酢酸沈殿により不溶性の沈殿物として沈殿させ、DE81 ペーパー（Whatman, Tokyo, Japan）に吸着させた。つぎに沈殿物の吸着した DE81 ペーパーをシンチレーションバイアルに封入して液体シンチレーションカウンター(BECKMAN, Tokyo, Japan)により DE81 ペーパーの吸着物由来の放射線量を測定した。T7 RNAP 変異体および野生型 T7 RNAP による測定値の比較により野生型 T7 RNAP との相対値を計算した。なお、T7 RNAP タンパク質の蛋白量は、プロテインアッセイキット（BIO-RAD, Tokyo, Japan）を用いて測定した。

4.2.4. T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の伸長活性の比較

T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の伸長活性の比較実験は Bonner[5]らの方法に従って以下の方法で実験を行った。本章実験方法(4.2.4)と同じ組成の反応液に、マウス reeler cDNA を含む環状 pBluescript DNA[6] を鋳型 DNA として 添加した。この反応液に 5 units T7 RNAP 変異体および野生型 RNAP 酵素標品を添加して 37℃で 15 分反応した後、RNA 合成産物を 6 M 尿素を含む 8%(w/v)ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、BAS2000 Image Analyzer（Fuji Film, Tokyo, Japan）によりオートラジオグラフィーを行うことで電気泳動パターンを得た。

4.2.5. T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の各 3'-dATP に対する取り込み効率の比較

T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の各 3'-dATP に対する取り込み効率の比較事件は、以下の反応条件を用いて行った。本章実験方法(4.2.4)と同じ組成の反応液および放射線量の検出方法において、終濃度 100 μM 3'-dATP となるように 3'-dATP 溶液を添加して、T7 RNAP 各酵素標品を用いて得られた放射線量の測定値

からT7 RNAP変異体と野生型T7 RNAPとの相対値を算出した。

4.2.6. T7 RNAP変異体F644Yと野生型T7 RNAPによる3'-dATP添加によるRNA合成実験

T7 RNAP変異体F644Yと野生型T7 RNAPによる3'-dATP添加によるRNA合成実験は、以下の反応条件を用いて行った。本章実験方法(4.2.5)と同じ反応液および電気泳動条件において、T7 RNAP変異体F644Yと野生型T7 RNAPの酵素標品を用いてRNA合成反応を行う際に終濃度500 μM、100 μM、50 μM、2.5 μM、1 μMとなるように3'-dATP溶液をそれぞれ添加して、RNA合成反応を行った。つぎにRNA合成産物の電気泳動およびオートラジオグラフィーを行い、電気泳動パターンを得た。

4.2.7. T7 RNAP変異体F644YおよびF667Yと野生型T7 RNAPの各3'-dNTPの取り込み効率の比較

T7 RNAP変異体F644YおよびF667Yと野生型T7 RNAPの各3'-dNTPの取り込み効率の比較実験は、以下の反応条件を用いて行った。本章実験方法(4.2.5)と同じ反応液組成および電気泳動条件において、T7 RNAP変異体F644YおよびF667Yと野生型T7 RNAP酵素標品を用いてRNA合成反応を行う際に3'-dGTP、3'-dATP、3'-dCTP、3'-dUTPをそれぞれ終濃度500 μMおよび250 μMとなるように添加してRNA合成反応を行った。RNA合成産物は電気泳動を行い、Tabor[7]らの方法に従ってT7 RNAPによる各3'-dNTPの取り込み効率を算出した。

4.2.8. T7 RNAP変異体F644Yと野生型T7 RNAPによる蛍光ターミネーターを用いたRNA合成実験

蛍光ターミネーターを添加した場合のT7 RNAP変異体F644Yと野生型T7 RNAPによるRNA合成実験は、以下の反応条件を用いて行った。反応液として40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2 mM spermidine$(HCl)_3$, 250 μM ATP, 500 μM GTP, 200 μM CTP, 500 μM UTP, 0.1 μM R6G-$(CH_2)_4$-3'-dATP、0.1 μM R110-$(CH_2)_4$-3'-dGTP、1 μM TMR-$(CH_2)_4$-3'-dUTP、5 μM ROX-$(CH_2)_4$-3'-dCTPを調製し、鋳型DNAとしてヒトThyrotoropin cDNA配列を持つPCR産物[8]10 ngを反応液に添加した。この反応液に25 units T7 RNAP変異体F644Yまたは野生型T7 RNAP酵素標品を添加し、37℃で1時間反応したのち、Sephadex G50 column(Amersham Biosciences, Tokyo, Japan)を用いてゲルろ過を行いRNA産物を精製した。精製したRNA合成産物はCentrifuge Concentrator VC-96(TAITEC, Saitama, Japan)によって蒸発乾固した。

乾燥した RNA 合成産物を ABI Prism 377 DNA Sequencer(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)の取扱説明書に従って調製した loading buffer 6 μl に溶解し、そのうち 2 μl を 90℃で 3 分間熱処理した。熱処理後の溶液は ABI Prism 377 DNA Sequencer で泳動し、取扱説明書に従って泳動結果を解析した。泳動したのちに残った RNA 溶液 4 μl は、-20℃で保存した。

4.3. 実験結果

4.3.1. T7 RNAP 変異体の構築

Fig. 4.1 に、本章における検討において構築した T7 RNAP 変異体の変異部位とその周辺の立体構造上の特徴を示す。本章では、T7 RNAP の基質である NTP のリボースの 3'-OH 基との相互作用に関与する T7 RNAP タンパク質のアミノ酸部位を探索し、相互作用に関与するアミノ酸部位の変異体の構築することにより 3'-dNTP の取り込みが改善した T7 RNAP 変異体の作製を試みた。さらに、このような T7 RNAP 変異体を用いることで TS 法における蛍光ターミネーターの取り込みを改善し、シークエンスシグナルの上昇とともにノイズシグナルを解消することを目的として検討を行った。まず、T7 RNAP と NTP のリボースの 3'-OH 基との相互作用部位の候補としては、これまでの T7 RNAP の機能解析および T7 RNAP の構造解析[9]の報告を基にして、T7 RNAP において polymerase 活性を有する polymerase ドメインに存在する Helix Y(625-634 aa)-loop(635-648 aa)-Helix Z(649-658 aa)-loop(658-684 aa)の領域に注目した。これらの領域に位置する K631, Y639, G640, D812, D537 は Osumi-Davis[10]らの報告で T7 RNAP タンパク質表面にあると予測されている。また、D812, D537 は polymerase 活性発現に重要な二価カチオンとの相互作用に関与していることが示されている[11]。さらに、K631, Y639, G640 は polymerase ドメイン中の motif B およびその近傍に位置しており、Y639 については NTP を取り込む際に NTP のリボースの 2'-OH 基との相互作用において重要な機能を有していることが報告されている[12]。Motif B は Motif C とともに様々な polymerase において活性発現に関わる重要な領域であることが報告されている[13]。T7 RNAP に関するこれらの報告とは別に DNAP の機能解析において、DNAP の基質である dNTP のリボースの 3'-OH 基または 2'-H 基との相互作用について、分子内に芳香族環を有するアミノ酸が関与していることを示す報告が複数されている。たとえば *E. coli* DNA polymerase I の F762, F766[14, 15]、*Taq* DNA polymerase の F667[7]、MMLV Reverse transcriptase においては F155 が[16]、Mycobacterium DNA polymerase I においては Y737[17]がリボースの 2'や 3'-OH 基との相互作用に重要であることが報告され、これらの報告はリボースの 2'または 3'が OH 基を認識することが示唆されるアミノ酸として、アミノ酸分子内に芳香族環を有するフェニルアラニン

やチロシン残基が機能していることを報告している。これらの知見から 3'-OH 基との相互作用部位の候補として T7 RNAP の 625 aa から 684 aa の領域に位置する芳香族アミノ酸である F644、F646 および F667 を選択した。さらに、これらの部位以外に polymerase ドメインにあり T7 RNAP タンパク質表面に位置することが示唆される F733、F782 および F882 も候補として選択した。本論文では、さらに T7 RNAP の Y639F と 2'-OH 基との相互作用に関する報告[12]や *E. coli* DNA polymerase と 3'-OH 基との相互作用に関する報告[7]を踏まえて、polymerase タンパク質と NTP のリボースの 3'-OH 基との相互作用において、polymerase タンパク質のフェニルアラニン残基中に存在する芳香族環のパラ位の-H 基と NTP のリボースの-OH 基との水素結合を介した相互作用の形成をすると仮定した。このフェニルアラニン残基のチロシン残基への置換により、リボースの 3'-H 基とチロシン残基の芳香族環のパラ位に存在する-OH 基が新たに相互作用を形成できる可能性を考えたのである。3 章で構築した蛍光ターミネーターのリボースの 3'位は-H 基であり、上記の仮説に従えば、T7 RNAP において 3'-OH 基との相互作用に関与するアミノ酸部位をチロシン残基に置換した変異体を構築することで、野生型 T7 RNAP においては取り込みの悪い蛍光ターミネーターとの相互作用を形成することにより蛍光ターミネーターの取り込みが改善できると考えた。蛍光ターミネーターの取り込みの改善によるシークエンスシグナルの上昇に伴い、3 章において明らかになったノイズシグナルの減少とこれに伴うシークエンスエラーの解消が期待された。

以上のような理由により本章では T7 RNAP の F644、F646、F667、F733、F782、F882 について、T7 RNAP 変異体 F644Y、F646Y、F667Y、F733Y、F782Y、F882Y を構築した。

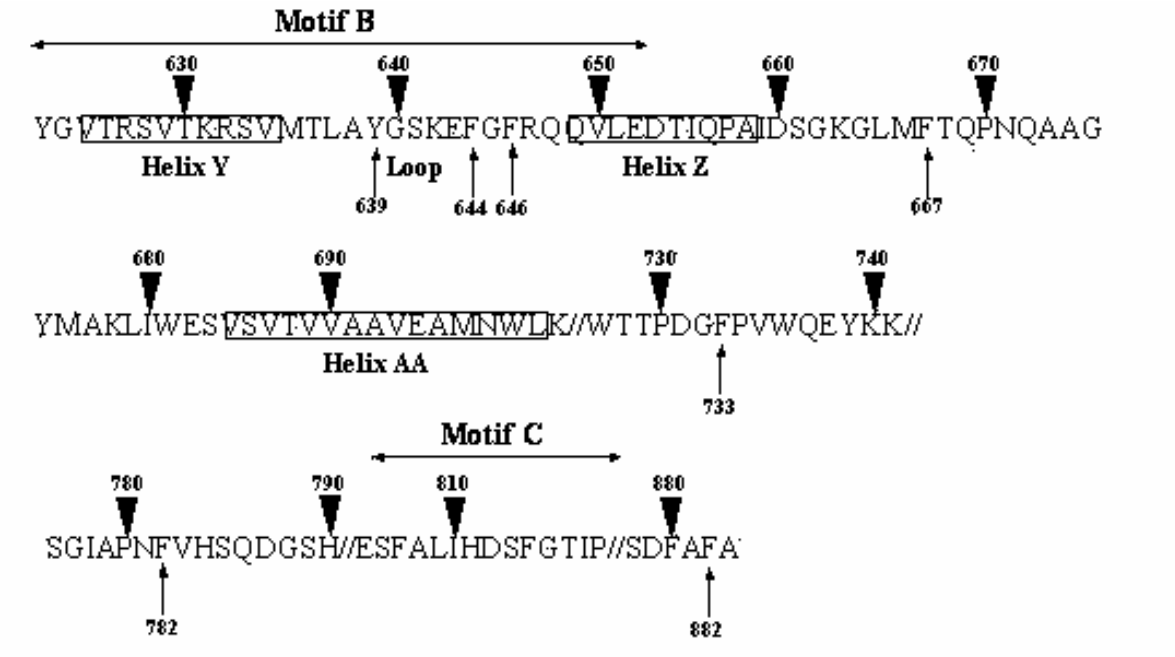

Fig. 4.1 Mutation sites of T7 RNAP mutant.
The mutated residues and highly conserved motifs among various DNA and RNAP are indicated in this figure. The motifs and mutated sites are located above and below the amino acid sequence, respectively. Motif B, Motif C, HelixY, HelixZ and HelixAA are located at 625-652, 805-818, 625-634, 649-658 and 684-699, respectively. The series of T7 RNAP mutants designed in this study consisted of F644Y, F646Y, F667Y, F733Y, F782Y, F882Y and Y639F.

4.3.2. 変異導入による T7 RNAP の酵素活性への影響

Fig. 4.2、Table 4.1 および Table 4.2 に、T7 RNAP 変異体の野生型 T7 RNAP と比較した伸長活性、polymerase 活性、3'-dATP の取り込み効率の検討結果を示す。まず Table 4.1 は T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の polymerase 活性の比較検討結果を示す。構築した T7 RNAP 変異体のうち、T7 RNAP 変異体 F882Y は野生型 T7 RNAP と比較して著しい polymerase 活性の低下が認められた。F882 は RNA 合成反応において rNTP の塩基部分と T7 RNAP との相互作用に関与しているアミノ酸残基であるとの報告[19]があり、変異導入により NTP との親和性の低下を引き起こし polymerase 活性の低下が引き起こされたと考えられる。その他の T7 RNAP 変異体においても数倍程度の活性低下が認められたが著しいものではなく、この結果はフェニルアラニンからチロシンへの変異が構造変化の少ない変異であることに起因すると考えられる。この実験結果から T7 RNAP 変異体 F882Y 以外の変異体については実用に十分耐えうる polymerase 活性を有していると考えられる。

Table 4.1 Relative activity of T7 RNAP mutant

Mutation Site	Relative activities of RNAP activity comparing with Wild-type
F882Y	N.D.
F782Y	0.31
F733Y	0.65
F667Y	0.56
F646Y	0.39
F644Y	0.63
F644Y/F667Y	0.45
Y639F	0.12
Wild-type	1.00

The relative activity of each RNAP mutant was measured as the incorporated rate of [α-^{32}P]UTP. The reaction was performed in the presence of 250 μM each RNTP using the plasmid DNA digested by *Pvu*II as the template. ND indicates that no activity was detected. Total reaction aliquots were spotted onto DE81 paper, and after washing, the retained radioactivity of DE81 paper was counted.

つぎに、Fig. 4.2 に T7 RNAP 変異体と野生型 T7 RNAP の伸長活性についての比較実験結果を示す。この実験ではマウス reeler cDNA を含む環状 plasmid DNA[6]を鋳型 DNA とし、各酵素を用いて合成された RNA 合成産物の鎖長を電気泳動パターンにより比較することで伸長活性の違いを検討した。Fig. 4.2 においては野生型 T7 RNAP と比較して T7 RNAP 変異体 F667Y、F646Y および Y639F ではわずかな違いが認められたが、優位な変化は認められなかった。さらにこれらの変異体と T7 RNAP 変異体 F882Y 以外の変異体による伸長活性には違いがほとんど見られなかった。この結果から、T7 RNAP 変異体 F882Y 以外の T7 RNAP 変異体では野生型 T7 RNAP との優位な差は認められず、polymerase 活性だけではなく伸長活性についても十分に実用に耐えうると考えられた。

Fig. 4.2 Processivity of T7 RNAP mutants
The assay method used in this study was described previously[5]. The processivity of each RNAP was measured by the incorporation of [α-^{32}P]UTP using a circular DNA as the template. In this reaction mixture, 10 μmol of closed circular reeler cDNA clone was used as the template. The final product was subjected to electrphoresis on 8% polyacrylamide gel containing 6 M urea and autoradiographed. lane 1, Wild-Type; lane 2, F644Y; lane 3, F667Y; lane 4, Y639F; lane 5, F646Y; lane 6, F733Y; lane 7, F782Y; lane 8, F644Y/F667Y; lane 9, F882Y.

さらにTable 4.2ではpBluescriptを制限酵素 *Pvu*IIにより線状化した2本鎖DNAを鋳型DNAとして、T7 RNAP変異体と野生型T7 RNAPの3'-dATPの取り込み効率の比較を行った。3'-dATP は、蛍光ターミネーター中にも含まれており、RNA polymerase反応に基質として取り込まれることによりRNA伸長が阻害されるRNA合成阻害剤である。この実験では3'-dATPによるpolymerase反応阻害を指標にしてT7 RNAP変異体の3'-dATPと基質としての取り込み効率の評価を行った。その結果、T7 RNAP変異体の中で T7 RNAP変異体 F644YおよびF667Yが

野生型 T7 RNAP と比較して 3'-dATP 添加により顕著に RNA 産物量が減少しており、T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y を用いた場合、野生型 T7 RNAP を用いた場合と比較して RNA 産物由来の放射活性の値が約 20%に減少した。このことは T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y が NTP と 3'-dATP の違い、すなわち NTP のリボースの 3'位における-OH 基と-H 基の構造の相違を識別する酵素活性が変化することで T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y が 3'-dATP を基質として効率良く取り込むようになったことが推測された。一方、T7 RNAP 変異体 F646Y では 3'-dATP の基質としての取り込み効率が野性型 T7 RNAP と比較して減少しており、F646Y の変異導入により 3'-dATP に対する基質特異性に影響を与えた可能性がある。また T7 RNAP 変異体 F644Y と F667Y に関しては 3'-dATP の取り込み効率が異なり、T7 RNAP 変異体 F644Y の 3'-dATP の取り込みが F667Y よりも優れていることから、この 2 つのアミノ酸部位の NTP との相互作用における作用機構が異なることも考えられる。

Table 4.2 Relative efficiencies of recognizing the 3'-OH groups of ribonucleotides as substrate in each mutated T7 RNAP and wild-Type.

Mutation site	Fold reduction by 3'-dATP
F644Y	98.24-99.12
F667Y	90.46-90.76
F644Y/F667Y	106.24-108.43
F782Y	21.89-23.22
F733Y	20.22-21.14
F646Y	8.23-9.44
Y639F	17.17-18.62
Wild-Type	19.12-19.35

For the template DNA, see Table 4.1. 3'-dATP concentrations were 100 μM. The experiment was triplicated. The value in this table represents the average of the relative reduction of the [α-^{32}P]UTP incorporation rate by each RNAP in the presence of the 100 μM 3'-dATP.

4.3.3. 3'-dATP 濃度変化による T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y と野生型 T7 RNAP 伸長反応の相違点

Fig. 4.3 に、鋳型 DNA としてマウス reeler cDNA を含む環状 plasmid DNA[6] を用い、濃度の異なる 3'-dATP の添加した場合に T7 RNAP 変異体 F644Y と野生型 T7 RNAP による伸長反応阻害の違いについての検討結果を示す。この実験に

おいてはTable 4.2の実験において3'-dATPの取り込み効率が顕著に上昇したことが明らかとなったT7 RNAP 変異体F644Yと野生型T7 RNAPについて、500 μMから1 μMの終濃度になるように3'-dATPを添加した場合、明らかに野生型T7 RNAPによる3'-dATPの取り込み効率はT7 RNAP変異体F644Yと比較して低く、本実験で検討したすべて3'-dATP濃度でRNA合成産物のほとんどが完全長RNA合成産物となっていた。しかし、T7 RNAP変異体F644Yを用いたRNA合成反応によるRNA合成産物は500 μM、250 μM、100 μMではほとんどが低分子領域で終結しており、完全長まで伸長しているRNA産物は全体の数%であった。この結果と同様の結果はT7 RNAP変異体 F667Yを用いた同様の実験を行った場合でも認められた（データ省略)。 この結果からT7 RNAP変異体 F644 および F667の２つのアミノ酸残基はNTPのリボースの3'-OH 基と相互作用に重要な部位であることが明らかとなった。このような効果は、同様の実験方法により、*E.coli* DNA polymerase I 、*Taq* DNA polymeraseやT7 DNA polymeraseなどによっても確認されている[7]。

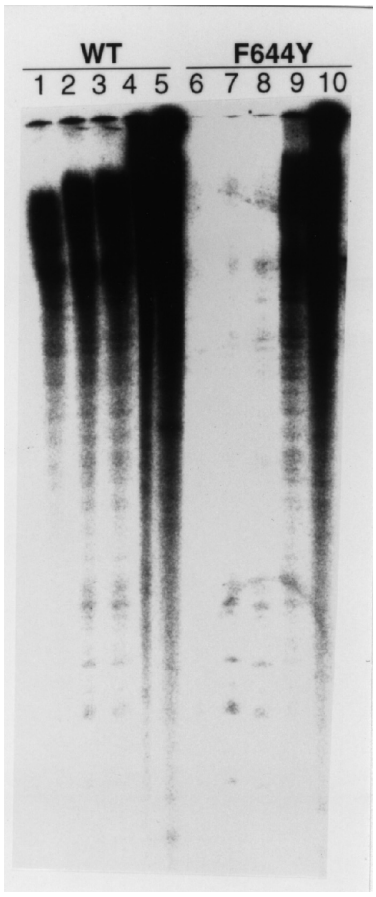

Fig. 4.3 Chain termination study for the presence of the incorporated of 3'-dNTPs and rNTPs in F644Y and wild-type T7 RNAP
Template DNA and electrophoresis conditions are given in Fig. 4.2. Each lane also had Wild-type (WT) and F644Y mutant RNAP (lane 1-5 and lane 6-10, respectively). 3'-dATP concentrations in lanes 1 and 6, 500 μM; lanes 2 and 7, 100 μM; lanes 3 and 8, 50 μM; lanes 4 and 9, 2.5 μM; lanes 5 and 10, 1 μM.

4.3.4. T7 RNAP 変異体 F644Y、F667Y および野生型 T7 RNAP の各 3'-dNTP の取り込み効率の比較

Table 4.2 および Fig. 4.3 の実験結果から 3'-dATP の取り込み効率の上昇が明らかとなった T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y について、Table 4.3 においては、野生型 T7 RNAP と比較した各 3'-dNTP の取り込み効率の違いについて示している。この実験においては環状プラスミド DNA を鋳型 DNA として用い、各 3'-dNTP を添加することによる RNA 合成量の減少の程度を調べることでそれぞれの T7 RNAP による 3'-dNTP の取り込み効率の違いを検討している。その結果、T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y は 3'-dNTP 種の違いにおいて差が認められるが、いずれの場合も野生型 T7 RNAP と比較して 3'-dNTP を取り込む効率

が共通にNTPと比較して100倍以上上昇していた。また、T7 RNAP変異体 F644Yおよび F667Y共通に3'-dUTPの取り込み効率の上昇が最も高く、さらに４種の3'-dNTPを比較すると上昇の程度は3'-dUTP>3'-dCTP>3'-dATP>3'-dGTPであり、purin塩基よりもpyrimidine塩基を有する3'-dNTPで上昇の度合いが優位となった。T7 RNAP変異体 F644Y と F667Y間では、各3'-dNTPの取り込み効率は若干の違いが認められた。これらの結果により F644および F667が3'-OH基の相互作用に関与するアミノ酸部位であることが明らかとなった。

Table 4.3 Relative selectivity of F644Y, F667Y and wild-Type T7 RNAP for 3'-dNTPs and rNTPs.

Mutation site	3'-dATP/ATP	3'-dUTP/UTP	3'-dCTP/CTP	3'-dGTP/GTP
F644Y	46.08-50.53	83.89-86.11	127.71-130.01	41.61-44.10
F667Y	38.76-41.81	68.23-70.32	115.79-118.43	34.92-37.10
Wild-Type	0.23-0.24	0.31-0.34	0.59-0.61	0.30-0.34

The rates of each 3'-dNTPs incorporation to rNTPs are compared for F644Y and F667Y mutants and wild-type T7 RNAP. The template is given in Fig. 4.2 and Table 4.1, respectively. The 3'-dNTPs concentrations were 500 μM and 250 μM.

4.3.5. T7 RNAP変異体 F644Yを用いた蛍光ターミネーターの取り込み効率改善による効果

Fig. 4.5に、ヒト Thyrotoropin cDNA[8]PCR 産物を鋳型にして蛍光ターミネーターを基質として添加し、T7 RNAP変異体 F644Yおよび野生型 T7 RNAPを用いてRNA合成反応を行うことにより合成したRNA合成産物を蛍光自動DNAシークエンサーで解析することで、蛍光ターミネーター由来のシークエンスシグナルの変化およびノイズシグナル減少の効果について検討結果を示す。野生型 T7 RNAPと比較して、T7 RNAP変異体 F644Yによって合成されたRNA合成産物から得られたシークエンスシグナルは、野生型 T7 RNAPの解析結果において矢印で示すような高いノイズシグナルのためシークエンスエラーとなるシークエンスシグナルは顕著に低下し、正確なシグナルのみ顕著に上昇することが明らかとなった。この結果より、3 章において問題となった弱いシークエンスシグナルに起因したノイズシグナルの問題が T7 RNAP変異体 F644Yを用いることで解消できることが明らかとなり、TS法において正確なDNAシークエンス解析を行えることが示唆される結果となった。

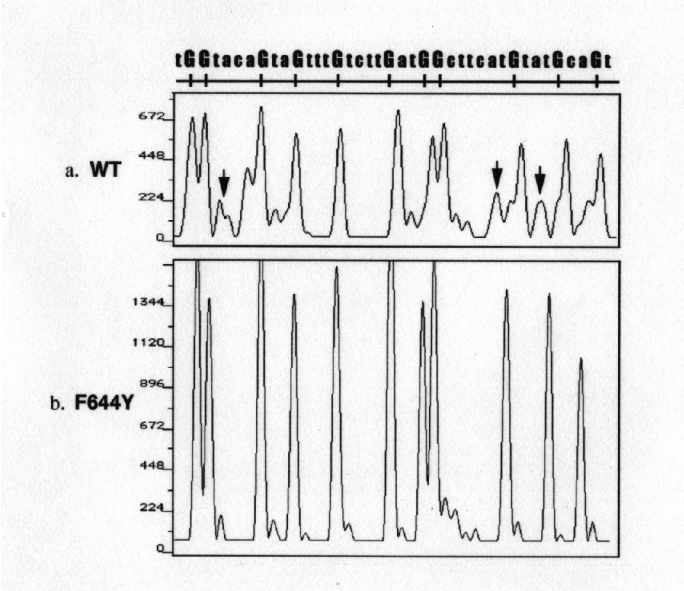

Fig. 4.4 Electrophoresis of Transcriptional Sequencing using F644Y mutant.
The reaction was carried out with PCR product of human thyrotropin-β CDNA[8] and F644Y or Wild-type(WT) T7 RNAP. This figure shows the G-signals. Arrowheads show the high background signals of wild-type T7 RNAP.

4.4. 考察

本章における検討により、T7 RNAP において F644 および F667 の２つのアミノ酸部位が NTP の 3'-OH 基を認識する特異性において重要な機能を果していることが明らかになった。T7 RNAP タンパク質の構造上、まず F644 は T7 RNAP の polymerase ドメインの内部にある Helix Y(624 aa-634 aa)と Helix Z(648 aa-658 aa)に挟まれた loop に存在する。この loop 内には、リボースの 2'-OH 基と相互作用し、基質特異性に関与する Y639 も存在し、NTP との相互作用に重要と考えられている[12]。また、F667 は Helix Z と Helix AA (659 aa-684 aa)に挟まれた loop に存在する。この２つの loop に存在する２つのアミノ酸部位が 3'-dNTP との相互作用および polymerase 反応の際の NTP 分子の安定化を行っていることが示唆される。

敷延するとこの２つのアミノ酸部位の変異体は 3'-dNTP の取り込み効率について野生型 T7 RNAP と比較して同様に改善している。しかし、T7 RNAP 変異体 F644Y は F667Y と比較して、T7 RNAP 変異体 F644Y の 3'-dATP の取り込み効率が上回っている。また、2'-OH 基の基質特異性発現に関与している Y639 の近傍に位置している。したがって、その物理的距離などから考え、F644 が 3'-OH 基との直接の相互作用部位として機能し、F667 は金属イオンなどを介して間接的に 3'-OH 基を認識する活性を有していると考えることもできる。また、これら２

つのアミノ酸部位を同時にチロシン残基に置換した二重変異体 T7 RNAP F644Y/F667Y では T7 RNAP 変異体 F644Y や F667Y を単独で使用した場合と比較して、3'-dATP の取り込み効率がさらに上昇している。したがって、F644 と F667 がそれぞれ別々の作用機構によって 3'-OH との相互作用に関与していることが示唆される。

これまでの *E coli* DNA polymerase I に関する報告では、dNTP のリボースの 3'-OH 基との相互作用に関与している F762 をチロシン残基に置換すると ddNTP の DNA 合成鎖への取り込み効率が 100 倍以上上昇するとされている[7]。このような結果が、本章の T7 RNAP 変異体における解析結果でも 100-270 倍の取り込み効率の改善として同様の効果が認められた。また本章の検討結果により T7 RNAP におけるリボースの 3'-OH 基との相互作用において F644 と F667 の 2 箇所が重要や役割をはたしていると考えられる。この結果から、これまでに DNAP による 3'-OH 基の認識機構において報告されている 1 つのアミノ酸だけではなく、複数のアミノ酸残基が直接および間接的に 3'-OH 基に相互作用することも考えられ、今後、他の DNAP、RNAP、Reverse transcriptase においてもあらたな知見が得られることも期待される。

本章において得られた T7 RNAP 変異体を用いて TS 反応を行うことで、3 章までに問題になっていたノイズシグナルを顕著に低下させることが可能である。また、正確な配列のシークエンスシグナルのシグナル強度のみが顕著に上昇させることで、TS 法により均一かつ正確な DNA シークエンス解析結果を得ることが可能であることが明らかとなった。

4.5. 結語

構築した T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y を用いて 3'-dATP を添加して *in vitro* 転写反応を行ったところ、野生型 T7 RNAP と比較して優位に転写終結し、3'-dNTPs の取り込み効率の顕著な上昇を示した。さらに、TS 法においても T7 RNAP 変異体 F644Y および F667Y を使用することにより、蛍光ターミネーター由来のシークエンスシグナルが上昇し、シークエンスエラーが減少することが明らかとなり、TS 法においてシークエンス精度の改善に寄与することができることから、TS 法が DNA シークエンス解析法として性能的に改善された。

参考文献

(1) F. W. Studier, J. Mol. Biol., 79, 237-248(1973).
(2) R. M. Horton, H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen, L. R. Pease, Gene, 77, 61- 68(1989).
(3) M. Chamberlin, J. McGrath, L. Waskell, Nature, 228, 227- 231(1970).
(4) V. Zawadzki, H. J. Gross, Nucleic Acids Res., 19, 1948(1991).

(5) G. Bonner, D. Patra, E. M. Lafer, R. Sousa, EMBO J., 11, 3767-3775(1992).
(6) S. Hirotsune, T. Takahara, N. Sasaki, K. Hirose, A. Yoshiki, T. Ohashi, M. Kusakabe, Y. Murakami, M. Muramatsu, S. Watanabe, K. Nakao, M. Katsuki, Y. Hayashizaki, Nat. Genet., 10, 77- 83(1995).
(7) S. Tabor, C. C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 6339 - 6343(1995).
(8) Y. Hayashizaki, K. Miyai, K. Kato, K. Matsubara, FEBS Lett., 188, 394 - 400(1985).
(9) R. Sousa, Y. J. Chung, J. P. Rose, B. C.Wang, Nature, 364,593- 599(1993).
(10) P. A. Osumi-Davis, M. C. de Aguilera, R. W. Woody, A. Y. Woody, J. Mol. Biol., 226, 37- 45(1992).
(11) A. Y. Woody, S. S. Eaton, P. A. Osumi-Davis, R. W. Woody, Biochemistry, 35, 144- 152(1996).
(12) R. Sousa, R. Padilla, EMBO J., 14, 4609- 4621(1995).
(13) R. Sousa, Trends Biochem. Sci., 21, 186-190(1996).
(14) L. S. Beese, V. Derbyshire, T. A. Steitz, Science, 260, 352- 355(1993).
(15) L. S. Beese, J. M. Friedman, T. A. Steitz, Biochemistry, 32, 14095 - 14101(1993).
(16) G. Gao, M. Orlova, M. M. Georgiadis, W. A. Hendrickson, S. P. Goff, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94, 407- 411(1997).
(17) M. Valerie, P. Huberts, Nucleic Acids Res., 24, 4845- 4852(1996).
(18) P. B. Vander Horn, M. C. Davis, J. J. Cunniff, C. Ruan, B. F. McArdle, S. B. Samols, J. Szasz, G. Hu, K. M. Hujer, S. T. Domke, S. R. Brummet, R. B. Moffett, C. W. Fuller. Biotechniques, 22, 758- 765(1997).
(19) K. A. Mookhtiar, P. S. Peluso, D. K. Muller, J. J. Dunn, J. E. Coleman, Biochemistry, 30, 6305- 6313(1991).
(20) Y. Huang, F. Eckstein, R. Padilla, R. Sousa, Biochemistry, 36, 8231 - 8242(1997).

第 5 章　TS 法の構築

5.1. 緒言

TS 法による DNA シークエンス解析において、シークエンスピークの重なりに起因してシークエンスエラーが生ずる配列の存在が確認され、正確な DNA シークエンス解析にはこの解消が必要であった。この現象はコンプレッションと呼ばれ、DNAP を用いたジデオキシ法においても認められる問題である。TS 反応により合成された RNA 合成産物を電気泳動により分離する際に、電気泳動中の RNA 分子内に水素結合を介した二次構造が形成されることにより、電気泳動上の RNA 分子の移動度が変化し、分子量による正確な分離が困難になることが主因と考えられる。

本章では、上記のコンプレッションに関する問題を解決することを目的として、以下の方法を検討した。すなわち、核酸分子内においては guanosine triphosphate(rGTP)と比較して、水素結合を介した 2 本鎖形成能が弱い inosine triphosphate（rITP）や 7-deaza-guanosine triphosphate（c^7-rGTP）などの rGTP のヌクレオチドアナログに着目し、これらを rGTP と置換して用いて TS 反応を行うことにより二次構造の解消および二次構造形成に起因するコンプレッションの解消が可能かどうかを検証した。さらに、本章までの開発成果である蛍光ターミネーター、変異型 T7 RNAP およびヌクレオチドアナログを含む TS 反応条件を用いて TS 法を構築し、その特長について評価した。また、本章では T7 RNAP による RNA 合成反応の促進効果を有する物質としてこれまでに促進効果の報告があった spermidine 以上の促進効果を有するポリアミンの探索を行った。促進効果が認められたポリアミンについては、TS 法における添加効果について検討し、機能を評価した。

5.2. 実験方法

5.2.1. 鋳型 DNA の調製

DNA シークエンス解析に用いるヒト Tyrotropin cDNA を含む PCR 産物は 0.1 M PCR プライマーTSH-F(5'-ACG,TTG,TAA,AAC,GAC,GGC,CAG,T-3')および PCR プライマーTSH-R(5'-TAA,CAA,TTT,CAC,AGG,AAA,CA-3')を用い、鋳型 DNA としてヒト Tyrotropin cDNA を含む pBluescript II DNA[(1)] 1 pg および 0.5 units Ex Taq DNA polymerase(Takara Bio, Shiga, Japan)を添加して PCR 反応を行うことにより PCR 産物を調製した。p53 エキソン 8 遺伝子を含む PCR 産物は、ヒト大腸がん細胞株 HT29(American Type Cell Collection, VA ,U.S.A)およびヒト胎盤ゲノム DNA 100 ng を鋳型 DNA として T7 プロモーター配列を含む PCR プライマ

ーP53-T7(5'-GTA,ATA,CGA,CTC,ACT,ATA,GGG,CAC,CTA,CCT,GGA,GCT,GGA,GC-3')およびPCRプライマーG2(5'-CCA,AGA,CTT,AGT,ACC,TGA,AG-3')を0.2 Mとなるように用い、0.5 units Ex Taq DNA polymerase(Takara Bio, Shiga, Japan)を添加したPCR反応によりp53エキソン8領域を含むPCR産物を調製した[2]。PCR法に用いるサーマルサイクラーはPTC-200 DNA Engine(MJ Research, CA , U.S.A)を使用した。PCR反応プログラムは、まず96℃で1分間、55℃で30秒、72℃で1分の反応を行い、つぎに96℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分の増幅反応を24回繰り返したのちに72℃で5分の後処理を行った。

5.2.2. T7 RNAPによるヌクレオチドアナログの取り込み実験

rGTPのヌクレオチドアナログであるrITP(Yamasa, Tokyo, Japan)やc^7-rGTPを用いたRNA合成反応における取り込み効率および至適濃度の検討実験を以下の方法で行った。実験に用いたc^7-rGTPおよびc^7-rATPはTolman[3]ら報告に従って合成した。RNA合成反応は40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 200 μM GMP, 200 μM ATP, 200 μM CTP, 200 μM UTP, 1 μCi [α-^{32}P] UTPを含む転写反応液に鋳型DNAとしてヒトThyrotoropin cDNA配列を有するPCR産物10ngおよびrGTPまたはヌクレオチドアナログを野生型T7 RNAP 25 unitsとともに添加し、37℃で1時間反応を行った。得られたRNA合成産物は7 M尿素を含む5%(w/v) Long Rangerポリアクリルアミドゲルで電気泳動後にBAS2000 Image Analyzer（Fuji Film, Tokyo, Japan）によりオートラジオグラフィーを行って電気泳動パターンを得た。

5.2.3. Pyrophosphataseタンパク質の精製

Pyrophospatase (PPase)タンパク質の精製は、パン酵母由来のPPase(Sigma, Tokyo, Japan）を購入し、以下の精製法により混入しているRNaseを除去して精製したPPaseを調製した。まず、購入したPPaseを20 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM EDTAを含むdialysis Bufferに懸濁したのちにdialysis Bufferに対して透析を行った。透析後のタンパク質溶液をSP Sepharose(Amersham Bioscience, Tokyo, Japan)に充層し、0 Mから0.1 MのNaCl濃度勾配を与えた条件下でPPaseタンパク質を溶出した。溶出したPPaseタンパク質を含む画分を、さらにQ-Sepharose(Amersham Bioscience, Tokyo, Japan)に充層して0 Mから1 MのNaCl濃度勾配を与えた条件下でPPaseタンパク質を溶出した。溶出画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することによりPPaseタンパク質に相当する約32 kDaのバンドを確認したのちに20 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM EDTA, 50%(v/v) glycerolを含むstorage bufferに対して透析し、-20℃にて保存した。

5.2.4. ヌクレオチドアナログを添加したTS反応

TS反応におけるコンプレッションの解消を目的として、ITPまたはc^7-rGTPをTS反応に添加した場合の検討実験を以下の反応条件を用いて行った。反応液としては、40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2 mM spermidine$(HCl)_3$, 2 mM GMP, 250 μM ATP, 500 μM GTP, 250 μM CTP, 500 μM UTP, 0.1 μM R6G-$(CH)_4$-3'-dATP、0.1μM R110-$(CH)_4$-3'-dGTP、1 μM TMR-$(CH)_4$-3'-dUTP、5 μM ROX-$(CH)_4$-3'-dCTPを調製し鋳型DNAとしてPCR産物10 ngを反応液に添加した。ヌクレオチドアナログを用いる場合にはrGTPと同量のrITPまたはc^7-rGTPをrGTPと置換して反応液に添加した。この反応液に25 units T7 RNAP変異体F644Yおよび10 units PPaseを添加して37℃で1時間反応したのち、Sephadex G25 column(Amersham Biosciences, Tokyo, Japan)を用いてゲルろ過を行いRNA産物を精製した。精製したRNA合成産物はCentrifuge Concentrator VC-96（TAITEC, Saitama, Japan）によって蒸発乾固した。乾燥したRNA合成産物をABI Prism 377 DNA Sequencer(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)の取扱説明書に従って調製したloading buffer 6 μlに溶解し、そのうち2 μlを90℃で3分間熱処理した。熱処理後の溶液はABI Prism 377 DNA Sequencerで泳動し、取扱説明書に従って泳動結果を解析した。泳動したのちに残ったRNA溶液4 μlは、-20℃で保存した。

5.2.5. CS法とTS法の最適鋳型DNA量の比較実験

TS反応については本章実験方法(5.2.2)におけるc^7-rGTPを使用した同条件で反応を行った。CS法についてはDye terminator FS Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)の製品説明書に従い、ABI Prism 377 DNA Sequencerで泳動し、取扱説明書に従って泳動結果を解析した。本実験においては鋳型DNAとして環状pBluescript SK（Stratagene, CA, U.S.A.）を用いた。

5.2.6. RNA合成反応の促進効果を有するポリアミンの探索

T7 RNAPによるRNA合成反応の促進効果のあるポリアミンの検討実験は以下の反応条件を用いて行った。40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 200 μM GMP, 250 μM ATP, 250 μM GTP, 250 μM CTP, 250 μM UTP, 0.2 μCi [α-^{32}P] UTPを含む転写反応液にpBluescript SKを制限酵素*Pvu*IIにより処理したDNAおよびポリアミンを終濃度2 mMになるように添加した。この転写反応液に野生型T7 RNAP酵素標品を5 units添加し、37℃、1時間の条件で反応を行った。反応により得られたRNA合成産物は6 M尿素を含む8%(w/v)ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動後にBAS2000 Image Analyzer（Fuji Film, Tokyo, Japan）によりオートラジオグラフィーを行って電気泳動パターンを得た。放射

線量をそれぞれの電気泳動上の RNA バンドの強度から測定し、ポリアミンによる促進効果を数値化した。

5.2.7. TS 法におけるポリアミン添加による効果の検討

TS 法において、ポリアミン添加による TS 反応の促進効果の検討実験は以下の反応条件を用いて行った。反応液として 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2 mM spermidine$(HCl)_3$, 2 mM GMP, 2.5 mM ITP, 250 μM ATP, 250 μM CTP, 500 μM UTP, 0.1 μM R6G-$(CH_2)_4$-3'-dATP、0.1 μM R110-$(CH_2)_4$-3'-dGTP、1 μM TMR-$(CH_2)_4$-3'-dUTP、5 μM ROX-$(CH_2)_4$-3'-dCTP を調製し、鋳型 DNA としてラムダファージゲノム DNA を含む PCR 産物 10 ng を反応液に添加した。この反応液に 25 units T7 RNAP 変異体 F644Y および 10 units PPase を添加して 37℃で 1 時間反応したのち、Sephadex G50 column(Amersham Biosciences, Tokyo, Japan)を用いてゲルろ過を行い RNA 産物を精製した。精製した RNA 合成産物は Centrifuge Concentrator VC-96（TAITEC, Saitama, Japan）によって蒸発乾固した。乾燥した RNA 合成産物を ABI Prism 377 DNA Sequencer(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)の取扱説明書に従って調製した loading buffer 6 μl に溶解し、そのうち 2 μl を 90℃で 3 分間熱処理した。熱処理後の溶液は ABI Prism 377 DNA Sequencer で泳動し、取扱説明書に従って泳動結果を解析した。泳動したのちに残った RNA 溶液 4 μl は、-20℃で保存した。

5.3. 実験結果

5.3.1. T7 RNAP によるヌクレオチドアナログ取り込み条件の検討

DNAP を用いたジデオキシ反応において dGTP のヌクレオチドアナログとしての dITP や c^7-dGTP、c^7-dATP を使用することがコンプレッションの解消に効果のあることが報告されている。dITP は、guanine 塩基と比較して、塩基の 3 位の-NH_2 基がない。したがって、Watson Crick 型の核酸間の二次構造形成における水素結合数は 2 個となり、dGTP が dCTP と水素結合を介して相補的に結合する場合の 3 個と比較して、その数は少なくなる。このため、dGTP に置換して dITP を用いることにより水素結合を介した核酸分子内の二次構造形成が抑制されることにより、ジデオキシ法におけるコンプレッションの解消に効果があることが報告されている[4]。また c^7-dGTP[5]および c^7-dATP[6]については非 Watson Crick 型の核酸間の二次構造形成の形態である Hoogsteen 型の水素結合に関与する 7 位の N がないことにより、二次構造の形成が抑制されることが示唆されている。このようなヌクレオチドアナログによるコンプレッション解消の効果が TS 法においても認められれば TS 法におけるコンプレッションを解消できる

可能性がある。そこでこれらのヌクレオチドアナログと同様の機能が期待され、T7 RNAP が基質としての取り込みが可能と考えられるヌクレオチドアナログ、すなわち dITP、c^7-dGTP および c^7-dATP のリボースの 3'位が-OH 基であるヌクレオチドアナログである rITP や c^7-rGTP、c^7-rATP を TS 法で用いることによってコンプレッションの解消が可能と推測した。

しかし、RNA 分子は DNA 分子よりも Tm 値が高く、DNA 分子と比較して強固な二次構造を形成することが知られており[7]、TS 法においては DNAP を用いたジデオキシ法の場合と比較して RNA 分子内により強固な二次構造の形成が推測される。また、これらのヌクレオチドアナログによる RNA 分子内の二次構造の形成抑制やコンプレッションへの影響に関する報告はない。さらに、これらのヌクレオチドアナログについては、T7 RNAP により基質として取り込まれることが報告[8]されている。しかし、TS 法における合成鎖長である数百塩基程度の比較的長い鎖長の RNA 合成において反応停止等を伴わず T7 RNAP に取り込まれるかどうかの検証や RNA 合成反応に用いる場合の至適濃度に関する報告もなされていない。そこで本章においてはこれらのヌクレオチドアナログを T7 RNAP による RNA 合成反応に使用する場合の最適濃度を検討した。さらに、得られた知見を基にして、実際に TS 法においてこれらのヌクレオチドアナログを用いた場合のコンプレッション部位の変化を測定することによって、コンプレッション解消の効果を検討した。

RNA 分子においては Fig. 5.1 に示すような Watson Crick 型の水素結合を介した核酸間の二次構造の形成のみならず非 Watson Crick 型[9]である Hoogsteen 型[10]の水素結合を介した二次構造の形成も考えられる。核酸における水素結合を介した二次構造の形成にはこのような二つの形式が主に考えられるが、Watson-Crick 型の場合は GC 間の水素結合数が多いことなどから Hoogsteen 型と比較して安定な構造を形成すると考えられている。

以上の背景より、TS 法におけるコンプレッションの解消を目的として、本章では核酸間の水素結合形成の抑制効果が期待できる rITP や c^7-rGTP、c^7-rATP のようなヌクレオチドアナログを TS 反応に用いることによりコンプレッションの解消について検討した。

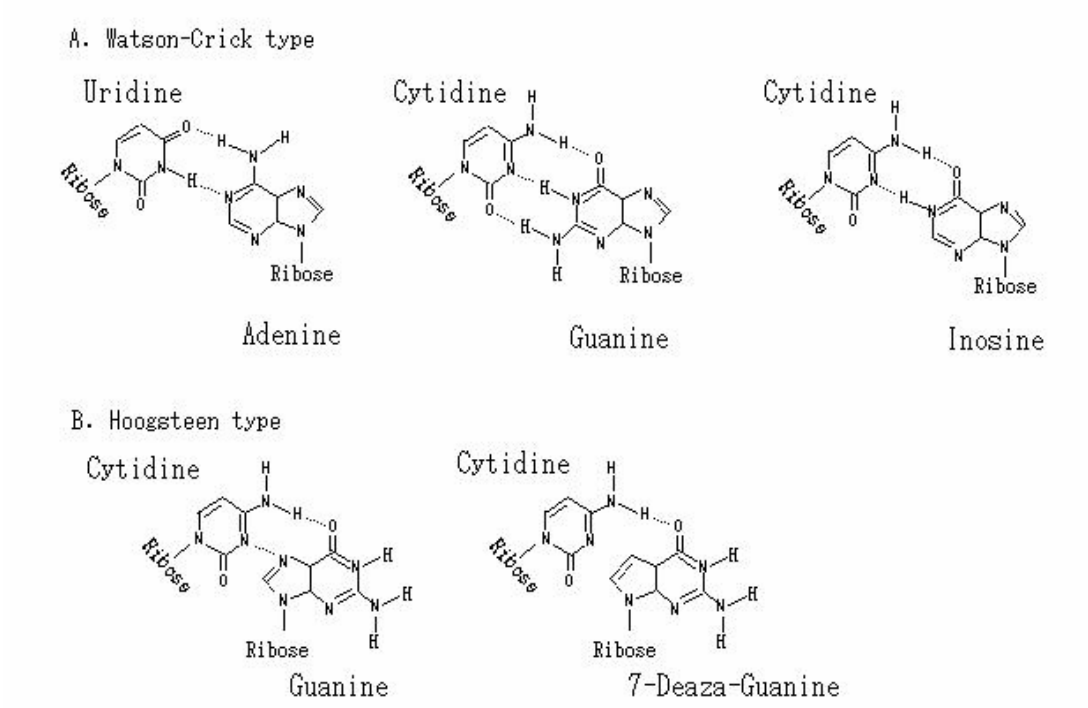

Fig. 5.1 Hydrogen bond formation among the ribonucleotides.

Fig. 5.2 に rGTP のヌクレオチドアナログである rITP、c^7-rGTP および c^7-rATP を T7 RNAP を用いた RNA 合成反応に用いた場合の最適濃度についての検討結果を示す。Fig. 5.2 の lane 1 から 4 においては RNA 合成反応において rGTP と置換して rITP を 200 μM から 1600 μM の濃度の範囲で添加した場合、濃度の増加に依存して RNA 合成産物量が増加することが明らかとなった。同様の傾向は c^7-rGTP を単独で添加した場合においても認められた(lane 5-8)。しかし、c^7-rGTP と c^7-rATP を 800 μM の濃度で添加した場合には RNA 合成産物がほとんど検出されず(データ省略)、1600 μM の濃度で添加した場合(lane 9)にも rITP および c^7-rGTP を単独で添加した場合と比較して顕著に RNA 合成量が少ないことを明らかにした。さらに、TS 反応に準じた T7 RNAP を用いた RNA 合成反応において、rITP および c^7-rGTP は基質として T7 RNAP に十分に取り込まれることが明らかとなった。この結果を踏まえて、TS 法における DNA シークエンス解析においては GC 塩基の関与するコンプレッションに起因するシークエンスエラーが主なものとなっていることと c^7-rATP を添加した場合には低い RNA 合成効率となることから、rITP および c^7-rGTP 添加による GC 間の水素結合を介した二次構造形成の抑制によるコンプレッションの解消について検討することとした。

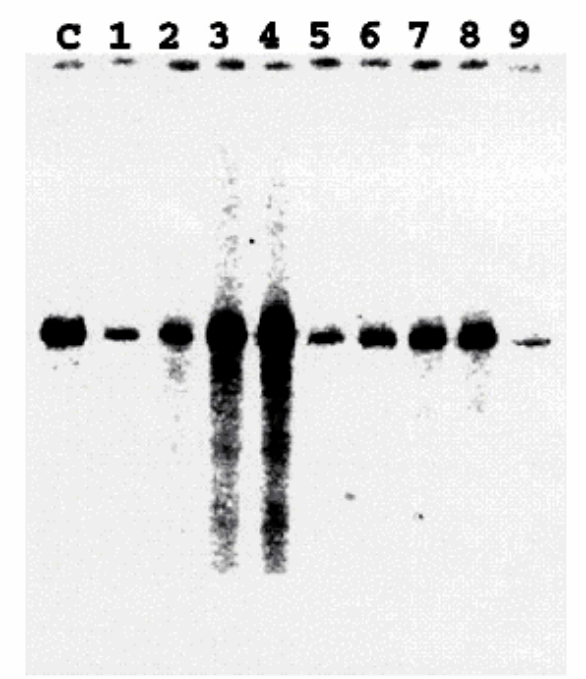

Fig. 5.2 Incorporation of the nucleotide analog in RNA synthesis. To examine whether several types of structure-destabilizing nucleotide analogs are incorporated into T7 transcripts, rITP, c^7-rGTP, was substituted for rGTP, or both c^7-rATP and c^7-rGTP were substituted for rGTP and rATP. The template gene is 10 ng of human TSH PCR product. The concentrations of substrates were: (C) standard transcription with 200 μM each of the four rNTPs, 200 μM of rATP, rCTP, rUTP with (1) 200 μM rITP, (2) 400 μM rITP, (3) 800 μM rITP, (4) 1600 μM rITP, (5) 200 μM c^7-rGTP, (6) 400 μM c^7-rGTP, (7) 800 μM c^7-rGTP, (8) 1600 μM c^7-rGTP, (9) 200 μM c^7-rGTP of rCTP and rUTP with 1600 μM c^7-rGTP and c^7-rATP.

5.3.2. ヌクレオチドアナログ添加による TS 法におけるコンプレッションの解消

Fig. 5.3 および Fig. 5.4 においては、rGTP を用いた TS 法による DNA シークエンス解析結果と rITP および c^7-rGTP を用いた場合の DNA シークエンス解析結果の比較を行い、rGTP を用いた場合に認められるコンプレッション部位の変化を比較することでそれぞれのヌクレオチドアナログによるコンプレッションの解消に対する効果を検証した。まず、Fig. 5.3 においては、ヒト Tyrotoropin cDNA 由来の PCR 産物中に存在するコンプレッション部位について rGTP を用いて行った TS 法による DNA シークエンス解析結果と c^7-rGTP を用いた場合の DNA シークエンス解析結果を比較した。Fig. 5.3 に示すように、rGTP を用いた TS 法の場合に認められる G のシークエンスピークと C のシークエンスピークのコ

ンプレッションに起因するシークエンスエラーが c^7-rGTP の添加によって分離し、正確に DNA シークエンス解析が行えることが明らかとなった。

つぎに、Fig. 5.4 においては、ヒト p53 エキソン 8 遺伝子領域を含む PCR 産物(Panel A)およびラムダファージゲノム DNA を含む PCR 産物(Panel B)を鋳型 DNA に用い、rGTP を用いて行った TS 法による DNA シークエンス解析結果と rITP を用いた TS 法による DNA シークエンス解析結果を比較した。Fig. 5.4(Panel A)には図中において矢印で示す 5 つのコンプレッション部位があり、矢印 1、2 および 3 で示すコンプレッション部位は G または C のシークエンスピークの関与するコンプレッション部位である。また、矢印 4 は GC 塩基にはさまれた ACUAA 配列をループ構造として有するコンプレッション部位(GC/ACUAA/GC)、矢印 5 は GC 塩基にはさまれた GAGGUAA 配列をループ構造として有するコンプレッション部位(GC/GAGGUAA/GC)である。Fig. 5.4(Panel B)においては、CAC およびその相補的配列である GUG にはさまれた GGUGGUG 配列をループ構造として有する配列におけるコンプレッション部位(CAC/GGUGGUG/GUG)である。rITP を使用することにより、図中において下線で示す領域が正確な配列へと変化している。したがって、Fig. 5.4 のコンプレッション部位について rGTP に置換して rITP を用いることによってコンプレッション現象を解消し正確な配列を決定できたことから、c^7-rGTP および rITP ともに TS 反応に添加することによりコンプレッションの解消が可能なことを明らかにした。

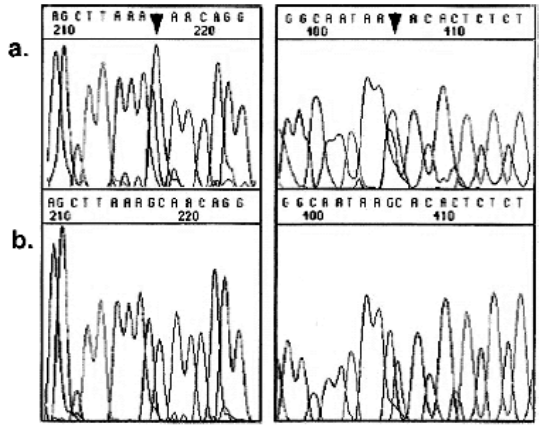

Fig. 5.3 Elimination of peak compression by use of c^7-rGTP in place of rGTP.

The arrows indicate two compression sites in human TSH cDNA using rGTP as the substrate a. Compressions in the corresponding sequence were eliminated by the use of 7-deaza-rGTP for the substrate b.

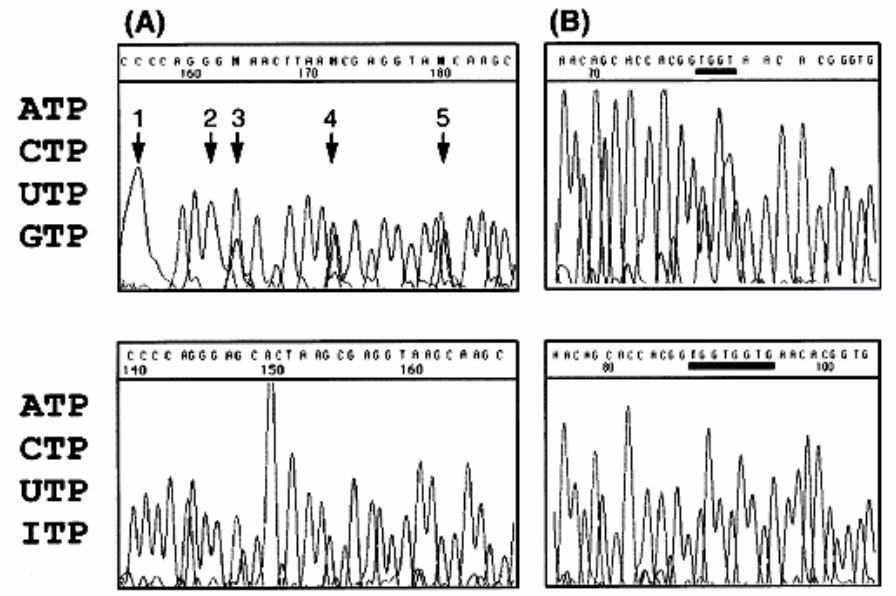

Fig. 5.4 Elimination of peak compression by use of rITP in the place of rGTP.
The arrows or underlines indicate compression sites in p53 exon8 (A) and lambda phage genomic DNA (B) using rGTP as the substrate (upper panel). Compressions in the corresponding sequence were eliminated by use of rITP for the substrate (lower panel).

5.3.3. TS 法の構築と TS 法の特長についての評価

前章までの成果および本章における TS 反応条件の検討により得られた成果を基にして、蛍光ターミネーター、T7 RNAP 変異体および TS 反応に最適化した反応条件を使用することで TS 法を構築し、その特長について評価した。TS 反応系には、これまでの開発成果に加えてさらにパン酵母由来の PPase を添加している。PPase は RNAP による RNA 合成反応の際に副産物として産生するピロリン酸を分解して 2 分子の無機リン酸とする反応を触媒する酵素である。RNA 合成反応が進行すると反応液中に副産物としてピロリン酸の蓄積が起こるが、ピロリン酸の蓄積により RNA 合成反応の平衡は逆反応すなわち分解反応に傾くことになる。このため見かけ上、RNA 合成反応の進行が徐々に停止することになる[11]。このような反応停止が TS 反応に部分的に起こるとシークエンスシグナルの停止に起因した均一性の低下を引き起こすことが示唆される。一方、反応系に PPase を添加することにより、上述の RNA 合成反応の停止が回避され、シークエンス反応の効率改善されることが期待される。また、T7 RNAP による RNA 合成反応に PPase を使用することで RNA 合成量が増加するとの報告[12]もあることから、TS 反応において PPase の添加効果については、Fig. 5.5 に示す実験に

より検討した。PPase を添加した場合には、無添加の場合に認められたシークエンスシグナルの高低差が減少し均一性が増すことが明らかとなり、シグナル強度の上昇も認められた。

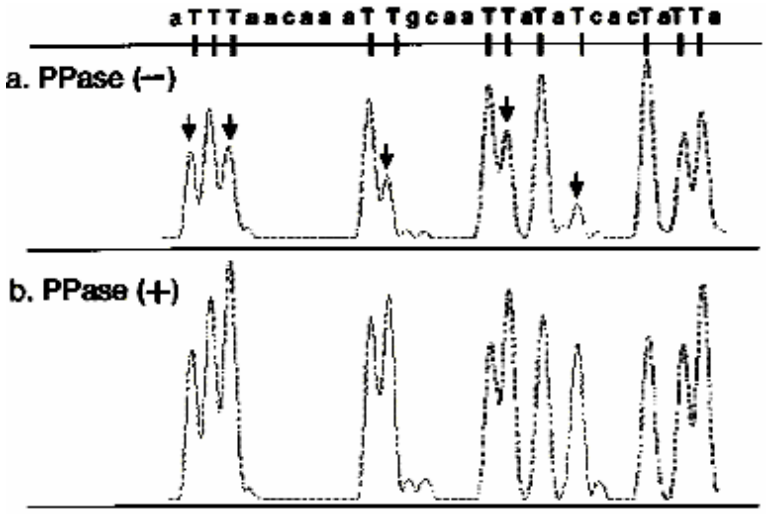

Fig. 5.5 Improvement of peak uniformity by use of PPase.
Sequencing reactions were performed in the absence or presence of PPase. Minus or plus indicates the absence or presence of PPase. All peaks indicating termination patterns with TMR-3'-dUTP are shown on the same scale. The arrows indicate sites relatively sensitive to pyrophospholysis a. Peak degradations in sensitive sites were prevented by PPase b.

つぎに、Fig. 5.6 にヒト Tyrotropin cDNA を有するプラスミド DNA を鋳型にして TS 法と CS 法によって行った DNA シークエンス解析結果を示す。CS 法による解析結果（panel B）と比較して、TS 法による解析結果(panel A)はシグナルの高低差が結果全体にわたって少なく、均一性に優れていることが明らかとなった。シークエンスピークの均一性が優れていることは DNA シークエンス精度の上昇に貢献し、DNA の変異部位の探索や検査などの高いシークエンス精度が要求される領域において信頼性の高い効果を発揮することが期待される。

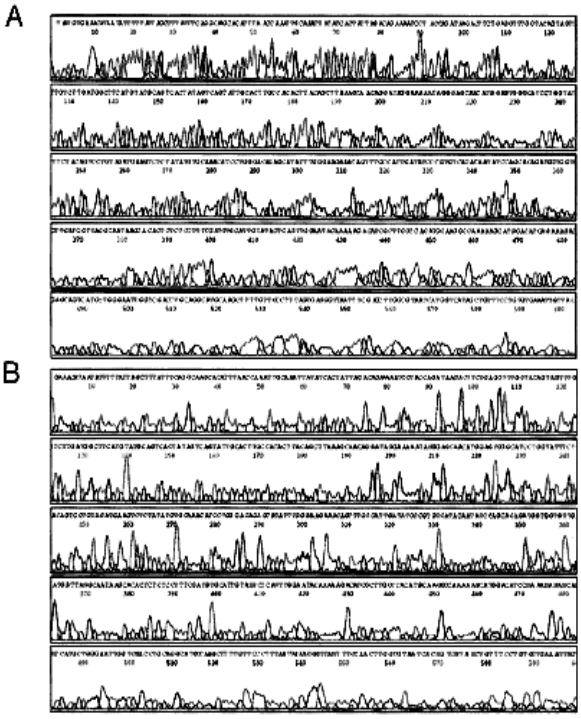

Fig. 5.6 Comparison of TS (A) with dye-terminator cycle sequencing (B) on the ABI 377 DNA sequencer.
100ng of human TSH cDNA was sequenced with both methods.

Fig. 5.6 に示す結果より TS 法は CS 法と比較してシークエンスピークの均一性が優れていることが明らかとなったが、さらに TS 法と CS 法において DNA シークエンス解析に使用する鋳型 DNA 量とシークエンス精度の関係を検討した Table 5.1)。500 ng と 200 ng の鋳型量においては、600 塩基までの DNA シークエンス解析では同等のシークエンス精度を示した。しかし、CS 法において 50 ng の鋳型 DNA 量の場合には、顕著にシークエンス精度が低下した。25 ng の鋳型 DNA 量では 90%以上のシークエンス精度を示すのは 1-100 塩基までの領域だけであり、それ以降は解析に耐えうる結果は得られなかった。一方、TS 法においては鋳型 DNA 25 ng から 500 ng を使用した場合には 1-500 塩基の領域において良好なシークエンス精度を示し、鋳型 DNA 量 10 ng でも 1-400 塩基までの領域で 93%以上のシークエンス精度を示した。以上より、TS 法は CS 法と比較して少ない量の鋳型 DNA からも良好なシークエンス精度で DNA シークエンス解析が可能なことを明らかにした。

Table 5.1 Effects of template amounts on sequence accuracy.

Sequencing protocol	Amount of plasmid, ng	Bases 1–100	101–200	201–300	301–400	401–500	501–600
Dye-terminator cycle sequencing	500	99	99	100	100	94	85
	200	100	99	100	99	94	82
	100	99	99	100	96	86	56
	50	98	96	98	88	63	45
	25	96	79	67	51	39	42
	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Transcriptional sequencing	500	97	98	97	100	94	82
	200	97	96	97	97	94	74
	100	96	96	96	97	95	76
	50	96	96	97	95	95	83
	25	96	92	98	97	95	71
	10	96	92	97	93	77	50

n.d., not determined.

Fig. 5.7 には、CS 法では解析不能な未精製 PCR 産物を鋳型 DNA とした DNA シークエンス解析を TS 法によって行った結果を示す。PCR 産物を鋳型 DNA として用いるにあたり、検討実験において、等量の PCR 反応液と *in vitro* 転写反応液を混合した溶液を用いて *in vitro* 転写反応を行った場合でも、PCR 反応液の混合によると考えられる顕著な *in vitro* 反応の阻害が認められないこと、および PCR 産物を鋳型として *in vitro* 転写反応を行った場合に転写反応が起こることを明らかとした（データ省略）。したがって、PCR 産物を鋳型 DNA として利用した DNA シークエンス解析を TS 法によって行えることの可能性を見出した。Fig. 5.6 では、鋳型 DNA としてヒト大腸がん細胞株 HT29 由来の p53 エキソン 8 遺伝子領域を含む PCR 産物を鋳型 DNA として未精製のまま用いた場合に TS 法による DNA シークエンス解析が正確に行えるか否かの点について、p53 エキソン 8 遺伝子上に存在する点変異の検出を行うことにより調べることとした。この p53 エキソン 8 遺伝子領域では p53 の R274H 変異を引き起こす DNA 変異である G から A への点変異の存在が HT29 細胞株において確認されている。この鋳型 DNA の DNA シークエンス解析について TS 法を用いた場合、ヒト胎盤ゲノム DNA 由来の PCR 産物では CGT となっている配列が HT29 由来の PCR 産物では CAT となっており、TS 法によるこの変異部位の DNA シークエンス解析ではシークエンスピークの G と A が重なったヘテロ型の点変異として正確に検出できることが明らかとなった。以上より、TS 法では CS 法と異なり未精製の PCR 産物も反応前の精製処理を必要とせずに、直接シークエンス解析の鋳型 DNA として用いることが可能であった。

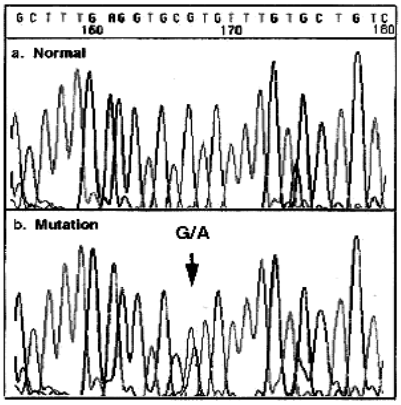

Fig. 5.7 Detection of heterozygotes by TS.
The top chromatogram shows sequence of p53 exon 8 PCR product by amplification of wt DNA. The lower chromatogram shows the heterozygous point mutation from 274R(CGT) to 274H(CAT) in human colon carcinoma cell line HT29.

5.3.4. ポリアミン添加による TS 法への効果の検討

本章においては、TS 法による DNA シークエンス解析において検出感度の向上を目的とした研究を実施した。とくに、他の研究者によって、polymerase 活性の上昇への効果が報告されているポリアミンに注目して、T7 RNAP による RNA 合成反応を促進する化合物を探索することとした。ポリアミンは分子内に複数の-NH_2基を有する分子であり、細胞分裂や遺伝子発現の際に不可欠であることが明らかにされている[13]。また、SP6 RNAP および T7 RNAP のようなバクテリオファージ RNAP[14]やヒトおよびマウス 由来 RNAP[15, 16]などに関して、polymerase 活性を上昇させる効果が報告されており、ポリアミンが鋳型 DNA と polymerase タンパク質との複合体を一時的に安定化することを示唆する結果と解釈されている。T7 RNAP については直鎖状のポリアミンである spermidine が T7 RNAP の polymerase 活性を上昇させるとの報告がある[13]。

Fig. 5.8 では、T7 RNAP による RNA 合成反応の促進効果を示すポリアミンの探索を行い、数種のポリアミンについて明らかとなった RNA 合成反応の促進効果と spermidine による促進効果を比較した。Fig. 5.8 では、制限酵素 *Pvu*II で切断した線状 pBluescript DNA を鋳型 DNA として用い、T7 RNAP による RNA 合成反応においてポリアミンを使用した場合の RNA 合成産物量の変化を比較することでポリアミンによる RNA 合成反応の促進効果について検討した。cadaverine、1,8-diaminooctane を添加した場合に、spermidine を使用した場合よりも、RNA 合成反応の促進効果が認められ、ポリアミンを添加しない場合

と比較して 1,8-diaminooctane では 4.62 倍、cadaverine の場合は 3.40 倍の RNA 合成量の増加を確認した。Fig. 5.9 には、Fig. 5.8 において RNA 合成反応の促進効果が明らかとなった 1,8-diaminooctane および cadaverine とこれまでの報告で RNA 合成反応の促進効果が示された spermidine の構造を示す。これらのポリアミンは直鎖状の構造を有し、末端に $-NH_2$ 基を有する。しかし、同じく末端に $-NH_2$ 基を有する 1,3-diaminopentane や 1,9-diaminononane では RNA 合成反応の促進効果が認められなかった（データ省略）。本章において、RNA 合成反応の促進効果が認められたこれらポリアミンは終濃度 0.2-2 mM が最適濃度であることが明らかとなった。

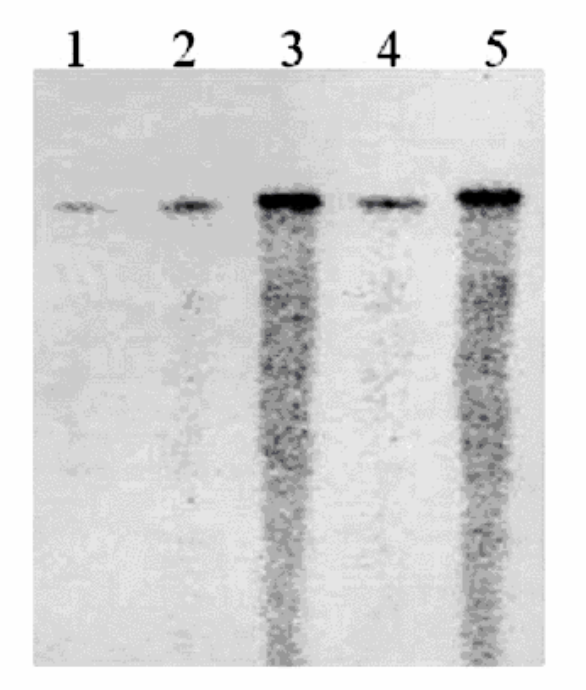

Fig. 5.8 Effects of polyamine addition on the transcription by T7 RNAP. Each lane indicates RNA products obtained in the absence of additive (lane 1), in the presence of spermidine (lane 2), cadaverine (lane 3), Agmatine(lane 4), and 1,8-diaminoocctane (lane 5).

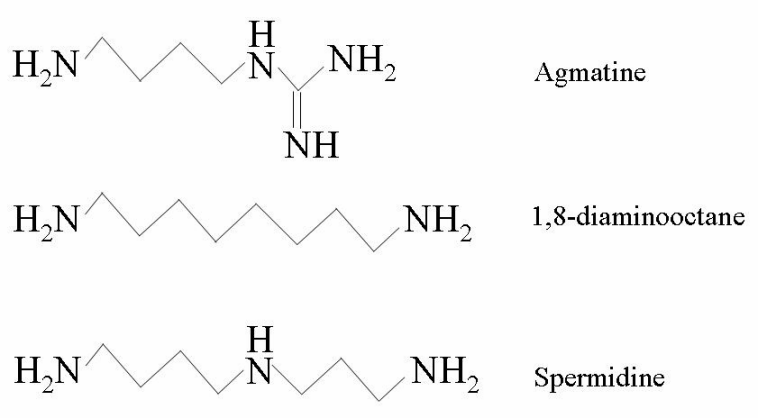

Fig. 5.9 Structures of linear polyamines as enhancers for T7 RNAP activity.

以上の結果をもとにして、T7 RNAP による RNA 合成反応の促進効果が明らかになったポリアミンを TS 反応に用いた場合の効果を検証した(Fig. 5.10)検討実験においては、通常よりも少ない量（10 ng）の鋳型 DNA で TS 法による DNA シークエンス解析に行った場合に、ポリアミン添加の有無によるシークエンスエラーの相違度を検討した。ポリアミンを添加しない場合には 150 塩基付近でシークエンスエラーが出現して 300 塩基付近ではシグナルの低下が著しくなり、DNA シークエンス解析が困難となった。

一方、1,8-diaminooctane を添加した場合には 400 塩基を超えてもシークエンスエラーは認められず、DNA シークエンス解析が可能であった。以上より、TS 法において 1,8-diaminooctane を添加することにより従来の TS 反応条件を用いた場合(50 ng)と比較してさらに少量(10 ng)の鋳型 DNA で DNA シークエンス解析が可能なことを明らかにした。

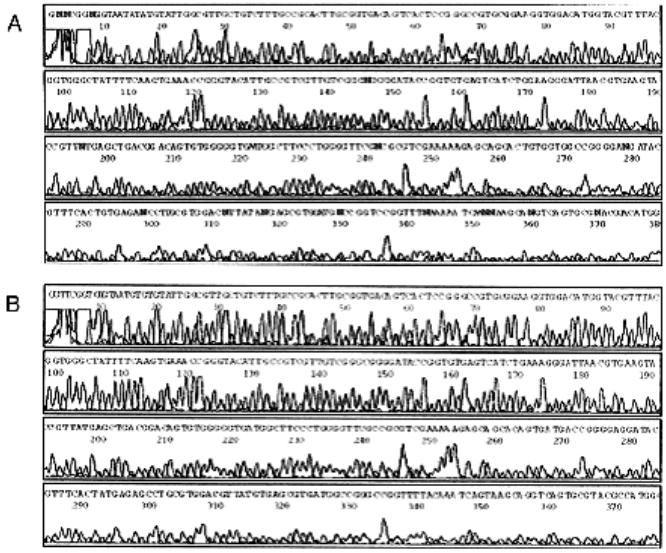

Fig. 5.10 Effects of 1,8-diaminooctane on the sequencing signals. Sequencing signals of the TS from a small amount of the template DNA in the absence of any additive (upper panel, A) and in the presence of 1,8-diaminooctane (lower panel, B).

5.4. 考察

本章では、TS 反応において rGTP に置換して rITP および c7-rGTP を使用することで rGTP を添加して反応した場合に見られたコンプレッションの問題が解消されることを明らかにした。コンプレッションの解消には、Watson Crick 型の核酸間の二次構造形成の抑制および Hoogsteen 型の核酸間の二次構造形成の抑制のいずれについてもその効果があった。しかし、高い精度で DNA シークエンス解析を行うためには、長鎖（一例として 400 bp 以上）にわたりシークエンスピークの均一性が確保されることが必要であり、Fig. 5.3 および Fig. 5.4 の結果から c^7-rGTP を用いた場合と比較して rITP を用いた場合が均一性に優れていることが明らかとなった。さらに、Watson Crick 型の水素結合による核酸間の二次構造形成において、rGTP と rCTP 間では 3 つの水素結合が形成されることから、Hoogsteen 型よりも強固な二次構造を形成すると考えられが、Watson Crick 型の水素結合による二次構造形成の抑制には rITP が必要である。DNA シークエンス解析法では多様な DNA 配列の解析を行うことが必要であり、このため、TS 法においてのコンプレッションの対策には、c^7-rGTP と比較してコンプレッションの抑制について、対応可能な DNA 配列種を多いことが示唆される rITP の使用が適していると考えられる。rITP を使用した場合の RNA 合成反応に関しては Fig. 5.2 の lane 3 および 4 では RNA 合成産物の低分子側にスメアな電気泳動像が認められているが、これらは RNA 合成反応の部分的な停止反応に

起因する可能性がある。しかし、TS 法においては RNA 合成反応の部分的な停止による RNA 合成産物は蛍光ターミネーターが取り込まれて停止した RNA 合成産物とは異なり、蛍光ターミネーターが取り込まれていないため、実際のシークエンス解析過程では視覚化されることはなく問題とならない。

ポリアミン添加による RNA 合成反応の促進効果については、反応溶液中において、3 価のカチオンとして存在する spermidine と比較して、2 価のカチオンとして存在する 1,8-diaminooctane および cadaverin が優れた促進効果を示した。ポリアミンは、負に帯電した DNA の凝集剤として用いられるが[17]、2 価のポリアミンは 3 価の spermidine と比較して、DNA の凝集効果が弱いことが示唆される。以上のような効果により、2 価のポリアミンによる鋳型 DNA の凝集が T7 RNAP による RNA 合成に適した条件となったことが、RNA 合成反応の促進効果を生み出していることが示唆される。

TS 法の特長に関する検討から、CS 法と比較して一回の DNA シークエンス解析に必要な鋳型 DNA 量が少ないことが明らかとなった。これは、T7 RNAP による RNA 合成の場合は鋳型 DNA のリサイクルが CS 法と比較して効率良く行われることによる。T7 RNAP による RNA 合成はこれまでの報告においては鋳型 DNA 1 μg から 30 μg を超える RNA 合成が可能であり、反応条件においてはさらに大量の合成も可能である。一方、CS 法では最終的に得られる 1 本鎖 DNA の量は CS 反応の繰り返し回数に依存しており、通常は酵素活性の低下や蛍光物質の安定性を踏まえて 25 サイクル程度の繰り返し回数が一般的である。よって、仮に CS 反応における各反応過程が 100%の効率で進んだ場合でも、1 μg の鋳型 DNA から 12.5 μg の 1 本鎖 DNA が合成されるのみである。以上より、TS 法による DNA シークエンス解析では、CS 法と比較して少ない鋳型 DNA 量で解析が行えることを支持している。さらに、本章において見出した RNA 合成反応の促進効果を有する直鎖状のポリアミンを TS 法において用いることにより、CS 法と比較してもより少ない鋳型 DNA 量で DNA シークエンス解析が可能なことを明らかにした。

また、本章の結果により CS 法においては DNA シークエンス解析に用いることが困難な未精製の PCR 産物が、TS 法においては反応前精製を行わずに使用できることを確認した。この結果から、TS 法を用いることで、現在の DNA シークエンス解析において鋳型 DNA としての使用頻度が極めて高い PCR 産物を迅速かつ低コストで DNA シークエンス解析できることが明らかとなった。

5.5. 結語

TS 法による DNA シークエンス解析においてコンプレッションによるシークエンスエラーが確認され、その解消を目的とした検討を行った。さらに、本章までの開発成果を基に TS 法を構築し、その特長について評価した。コンプレッションに関して guanosine triphosphate（rGTP）と比較して、水素結合を介した

2 本鎖形成能が弱い inosine triphosphate（rITP）や 7-deaza-guanosine triphosphate（c^7-rGTP）を rGTP と置換することにより解消出来ることを明らかにした。さらに、c^7-rGTP を使用して、ヒト大腸がん細胞株 HT29 の p53 遺伝子配列を有する PCR 産物中に存在する点変異(R274H)の正確な解析が可能であり、この解析において TS 法を用いることで未精製の PCR 産物の DNA シークエンス解析が可能であることも明らかとなった。加えて TS 法および CS 法において鋳型 DNA 量とシークエンス精度との関係を調べ、微量な DNA 量においても TS 法による解析結果は CS 法よりも少ない鋳型 DNA 量で優れたシークエンス精度を示し、1,8-diaminooctane の使用により、10 ng の微量な DNA からも高いシークエンス精度による解析を可能とした。

参考文献

(1) Y. Hayashizaki, K. Miyai, K. Kato, K. Matsubara, FEBS Lett., 188, 394 - 400(1985).

(2) Y. Murakami, K. Hayashi, S. Hirohashi, T. Sekiya, (1991) Cancer Res. 51, 5520- 5525(1991).

(3) R. L. Tolman, R. K. Robins, L. B. Townsend, J. Am. Chem. Soc., 91, 2102-2108(1969).

(4) S. Tabor, C. C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4767-4771(1987).

(5) S. Mizusawa, S. Nishimura, F. Seela, Nucleic Acids Res., 14, 1319-1324(1986).

(6) H. Yamanaka, D. Nakajima, O. Ohara, DNA Res., 3, 81-86(1996).

(7) G. Sarkar, H. S. Yoon, S. S. Sommer, Nucleic Acids Res., 20, 871-878(1992).

(8) J. F. Milligan, O. C. Uhlenbeck, Meth. Enzymol., 180, 51-62(1989).

(9) J. D. Watson, F. H. C. Crick, Nature, 171, 737-738(1953).

(10) K. Hoogsteen, Acta Crystallographica, 12, 822-823(1959).

(11) S. Tabor, C. C. Richardson, J. Biol. Chem., 265, 8322- 8328(1990).

(12) P. P. Cunningham, J. Ofengand, Biotechniques, 9, 713-714(1990).

(13) A. E. Pegg, Biochem. J., 234, 249-262(1986).

(14) J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, Nucleic Acids Res., 15, 8783-8798(1987).

(15) D. G. Blair, Int. J. Biochem., 16, 747-756(1984).

(16) D. G. Blair, Int. J. Biochem., 17, 23-30(1985).

(17) J. Pelta, F. Livolant, J. L. Sikorav, J. Biol. Chem., 271, 5656-5662(1996).

第 6 章　TS 法によるシークエンス反応時間の優位性の評価

6.1. 緒言

前章までの検討により、TS 法は CS 法と比較して、未精製の PCR 産物を直接的に鋳型 DNA として用いることが可能なこと、DNA シークエンス解析のために必要とされる鋳型 DNA が少量ですむこと、および DNA 解析過程におけるシークエンスピークの均一性が優れていることなどを示し、TS 法の優位性を明らかにした。

本章では、実際の使用を想定して、TS 法によるシークエンス反応時間について検討した。すなわち、TS 法の原理からは CS 法と比較して、シークエンス反応時間が短いことが予想されていたためで、この点に関する TS 法の優位性について評価を行った。さらに本章では、TS 法による DNA シークエンス解析に適した鋳型 DNA を調製できるクローニングベクターの構築を行い、その特長についても検討した。

6.2. 実験方法

6.2.1. 鋳型 DNA の調製

DNA シークエンス解析に用いるヒト *EGFR* エキソン 19 遺伝子を含む PCR 産物[(1)]は、T7 promoter または T3 promoter 配列を EGFR 遺伝子配列にアニーリングする配列に付加した 0.3μM PCR プライマー E19-F-T7(5'-GGC,TAA,TAC,GAC,TCA,CTA,TAG,GGA,GAC,ATG,TGG,CAC,CAT,CTC,ACA,A－ 3')および PCR プライマー E19-R-T3(5'-GGC,AAT,TAA,CCC,TCA,CTA,AAG,GGA,GAC,AGC,TGC,CAG,ACA,TGA,GAA,A-3')を用い、鋳型 DNA としてヒトゲノム DNA(Promega, Tokyo, Japan)200 ng および 0.5 units GeneTaq NT(Nippon gene, Tokyo, Japan)を添加して PCR 反応を行うことにより PCR 産物を調製した。PCR 法に用いるサーマルサイクラーとしては PTC-200 DNA Engine(MJ Research, CA , U.S.A)を使用した。PCR 反応プログラムは 94℃で 3 分間の熱変性処理ののちに 94℃で 45 秒、55℃で 45 秒、72℃で 3 分の増幅反応を 30 回繰り返したのちに 72℃で 5 分の後処理を行った。

6.2.2. *EGFR* PCR 産物の TS 法による DNA シークエンス解析

TS 法で用いた蛍光ターミネーターは、蛍光体として BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY 564/570、BODIPY 581/591 の N-hydroxysuccinimidyl ester(Molecular Probe, OR, U.S.A.)を用い、3 章実験方法（3.1.1.）と同様の方法によって構築した BODIPY FL-3'-dGTP、BODIPY R6G-3'-dATP、BODIPY 564/570-3'-dUTP、

BODIPY 581/591-3'-dCTP を用いた。各蛍光ターミネーターのリンカーにおけるメチレン鎖長は、BODIPY FL-3'-dGTP、BODIPY R6G-3'-dATP、BODIPY 564/570-3'-dUTP、BODIPY 581/591-3'-dCTP について、それぞれ 8、9、6、5 とした。また、T7 RNAP は F644Y の点変異と 172 および 173 アミノ酸残基が欠損した T7 RNAP 変異体 delta-F644Y 酵素標品を用いた。発現ベクター構築に当たり、4 章実験方法（4.2.2.）で構築した T7 RNAP F644Y 発現ベクターDNA を鋳型 DNA として用い、172 および 173 番目のアミノ酸残基[2, 3]をコードする塩基配列が欠損した T7 RNAP 遺伝子に対する PCR プライマーT7-delta-F(5'-TAC,AAG,AAA,GCA,TTT,ATG,CAA,GTT,GTC,GAG.G-3')と PCR プライマーT7-delta-R(5'-GAC,GTG,CCC,TAC,GTT,GAG,TTG,TTC, CTC,AAC-3')を添加して PCR 反応を行うことで T7 RNAP をコードする全長遺伝子および発現ベクター全長領域を含む PCR 産物を増幅し、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動およびアガロースゲルから抽出した。得られた DNA 断片（PCR 産物）を T4 DNA ligase によって連結し、T7 RNAP 変異体 delta-F644Y の発現ベクターを構築した。構築した T7 RNAP 変異体 delta-F644Y の発現ベクターを用いて 4 章実験方法（4.2.2.）と同様の方法により T7 RNAP 変異体 delta-F644Y 酵素標品を得た。

EGFR PCR 産物の TS 法による DNA シークエンス解析は、以下の反応条件を用いて行った。反応液としては、40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2 mM spermidine$(HCl)_3$, 0.4 mM $MnCl_2$、0.05% Tween 20、1 mM GMP, 250 μM ATP, 500 μM ITP, 250 μM CTP, 250 μM 5-Br-UTP, 0.1 μM BODIPY R6G-3'-dATP、0.2 μM BODIPY FL-3'-dGTP、0.4 μM BODIPY 564/570-3'-dUTP、0.3 μM BODIPY 581/591-3'-dCTP を調製し、さらに鋳型 DNA として PCR 産物 10 ng を反応液に添加した。この反応液に 50 units T7 RNAP 変異体 delta-F644Y および 0.005 units PPase を添加して 37℃で 1 時間反応したのち、CentriSep column(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)を用いてゲルろ過を行うことにより RNA 産物を精製した。精製した RNA 合成産物は蒸発乾固せずに ABI Prism 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)で泳動し、取扱説明書に従って泳動結果を解析した。

6.2.3. pTS1 ベクターの構築

pTS1 ベクターの構築は、以下の方法を用いて行った。まず T7 promoter および T3 promoter を含む DNA 断片を調製する目的でつぎの 8 つのオリゴヌクレオチド(5'-AGC,TGT,GCG,CGC,AAA,TTA,ACC,CTC,ACT,AAA,GGG,AGA,GAG,CT-3';5'-CTC,TCC,CTT,TAG,TGA,GGG,TTA,ATT,TGC,GCG,AC-3';5'-CCT,GCA,GGC,TAG,CTT,GCG,CAA,GGA,TCC,TAG,GCC,TGA,AGC,TT-3' ; 5'-GTC,GAC,AAG,CTT,CAG,GCC,TAG,GAT,CCT,TGC,GCA,AGC,TAG,CCT,GCA,GGA,GCT-3';5'-GTC,GAC,GAA,TTC,ACC,CGG,GAA,GAT,CTT,GCT,TAC,GTA,CGC,GTG,GTA,CCA,TGC,A-3';5'-TGG,TAC,CAC,GCG,TAC,GTA,AGC,AA

G,ATC,TTC,CCG,GGT,GAA,TTC-3';5'-TTC,TCC,CTA,TAG,TGA,GTC,GA,TTA,TGC,GCG,C－3'; 5'-TTC,TCC,CTA,TAG,TGA,GTC,GTA,TTA,TGC,GCG,C-3'；5'-AAT,TGC,GCG,CAT,AAT,ACG,ACT,CAC,TAT,AGG,GAG,AAT,GCA-3')を化学合成により調製した。つぎに8つのオリゴヌクレオチドの5'末端をT4 polynucleotide kinase(Nippon gene, Tokyo, Japan)を用いてリン酸化したのちにアニーニングし、T4 DNA ligase(Nippon gene, Tokyo, Japan)によってライゲーションすることで全てを連結した1本のDNAとした。得られたDNA断片の両末端は制限酵素 *Eco* RIまたは *Hind* IIIの切断末端と対合できる突出末端となるように設計してあり、このDNA断片を制限酵素 *Eco* RIと *Hind* IIIにより切断した pUC19とライゲーションすることでクローニングベクターpTS1を構築した。

6.2.4. CS法とTS法の反応時間の比較実験

TS反応については、鋳型DNA以外の反応条件は本章実験方法（6.2.2.）と同条件で反応を行った。CS反応については、Big Dye terminator Cycle Sequencing kit ver. 3(Applied Biosystems, Tokyo, Japan)の製品説明書に従って行った。TS反応およびCS反応によって調製されたRNAおよびDNA産物はABI Prism 310 Genetic Analyzerで泳動し、取扱説明書に従って泳動結果を解析した。本実験においては鋳型DNAとして環状 pBluescript SK（Stratagene, CA, U.S.A.)、pGEM3Zf(Promega, Tokyo, Japan)および pTS1 DNA を用いた。プラスミド DNA はアルカリ SDS 法による大腸菌からのプラスミド DNA の抽出に引き続き CsCl 密度勾配超遠心法により精製したものを用いた。

6.3. 実験結果

6.3.1. TS法におけるシークエンス反応時間の評価

本章では、近年開発されたキャピラリーDNAシークエンサー[4]をDNAシークエンス解析機器として用いた。キャピラリーDNA シークエンサーは、泳動ゲルを流動ゲルとすることで機械的に充填できることやジデオキシ法で調製されたDNA 産物も機械的に自動で高電圧を利用することにより、ゲル中にインジェクションすることが可能である。このためスラブゲル型DNAシークエンサーよりも人的作業が少なく簡便な操作法であることからキャピラリーDNA シークエンサーによるDNAシークエンス解析が主流となりつつある。

以上を背景として、本章における検討においてはこのキャピラリーDNA シークエンサーを用いてTS法についての検討を行うこととした。しかし、流動ゲルと架橋ゲルでは核酸の分離能が異なり、スラブ型DNAシークエンサー用に構築していた蛍光ターミネーターをキャピラリーDNA シークエンサーで解析するた

めに、蛍光ターミネーターにおける蛍光色素とリボースを連結するリンカー鎖長の変更による分子量の調整を行う必要がある。そこで、3 章で得られた成果を基にしてリンカー鎖長を変更し、合わせて rhodamine 色素と比較して量子収率が高く効率の良い蛍光の励起によるシグナル強度の上昇が期待される BODIPY 色素[5]を含む蛍光ターミネーターを構築し、本章における検討を行うこととした。

また、本章では 4 章で構築した T7 RNAP 変異体 F644Y にさらに 172 および 173 のアミノ酸残基の欠損を導入した T7 RNAP 変異体 delta-F644Y を構築し、本章における検討に用いている。Lykanov[2, 3]らの報告においてこれらのアミノ酸残基が欠損した T7 RNAP を用いて、T7 RNAP による転写反応の終結配列として知られているヒト由来 preproparathyroid hormone(PTH)遺伝子配列や T7 ファージ DNA の複製の際に見られる concatemer junction(CJ)配列などを鋳型 DNA にして RNA 合成した場合でも転写反応の終結が抑制されることが知られている[3]。本章では、TS 法による DNA シークエンス解析を行う上で PTH 遺伝子配列や CJ 配列のような転写反応終結配列に類似した遺伝子配列の DNA シークエンス解析を行うことが必要な場合も十分に想定されるため、T7 RNAP 変異体 delta-F644Y を構築し、以下の検討実験に用いることにした。

本章においてはまず、TS 法と CS 法による DNA シークエンス解析におけるシークエンス反応時間とシークエンス精度の関係について比較を行った。シークエンス反応時間について考える上で TS 法および CS 法で用いている polymerase の違いとそれに起因する反応機構の相違が大きな要因と考えられる。TS 法では T7 RNAP による RNA 合成反応を用いており、CS 法では *Taq* DNAP による DNA 合成反応を用いているが、T7 RNAP および *Taq* DNAP は伸長速度において顕著な差があり、その伸長速度は *Taq* DNAP の 60 塩基/秒[6]に対して T7 RNAP の伸長速度は 240 塩基/秒[7]と約 4 倍である。さらに、T7 ファージの宿主である大腸菌由来の *E. coli* RNAP や *E. coli* DNAP の伸長速度がそれぞれ 40 塩基/秒[8]および 50 塩基/秒[9]であることからも T7 RNAP が高い伸長活性を有していることがわかる。*Taq* DNAP と T7 RNAP の間には、このように大きな伸長速度の違いがあり、この伸長速度の相違によって、TS 法と CS 法で同じ精度の DNA シークエンス解析を行いたい場合には反応時間の差として顕著に現れることが示唆される。また、CS 法はサーマルサイクラーのような温調機器により各反応ステップが進行する方法であるが、このためにシークエンス反応時間は機器による温度上昇および下降に要する時間や各動作に関する機器の応答時間などが必要になり、シークエンス反応時間に上乗せされることになる。一方、TS 法は CS 法のような温調機器による温度変化は必要なく 37℃の恒温で反応進行が可能であり、各反応過程は酵素自身が有する polymerase 活性と helicase 様活性により進行させることが可能である。helicase は 2 本鎖 DNA 解離させ、1 本鎖 DNA とする酵素活性を有するものであり、T7 RNAP はこれと同等の酵素活性を有している。以

上の背景により、TS 法は CS 法と比較して短いシークエンス反応時間で DNA シークエンス解析が行える可能性を予想した。DNA シークエンス解析を短時間で行うことが可能になれば、感染症の原因菌の検査や手術中の病理検査などを現場で行い結果をすぐにフィードバックすることも可能になる。すなわち、短時間で結果を知ることが可能な DNA シークエンス解析は利便性のある方法として極めて有望視される。

以上を背景として、本章ではまず TS 法におけるシークエンス反応時間についての検討を行った。Fig. 6.2 は *EGFR* エキソン 19 遺伝子領域を含む PCR 産物を鋳型 DNA として TS 法による解析を行うにあたりシークエンス反応時間を 5 分とした場合の DNA シークエンス解析結果を示している。*EGFR* エキソン 19 遺伝子領域は進行性非小細胞肺がん(NSCLC)患者において、この領域中に存在する欠損変異が最近の研究において肺がん治療薬である Gefitiniv(商品名 Iressa)による副作用発現のマーカーとなることが明らかとなっており、この領域を調べることで抗がん剤の投与前に重篤な副作用の出現の有無を予測するマーカーとして期待されている[1]。Fig. 6.2 で示す *EGFR* エキソン 19 遺伝子領域を含む PCR 産物を鋳型 DNA とした DNA シークエンス解析結果は 5 分で、極めて短時間（CS 法では約 60 分)でありながらシークエンスエラーもなく解析が可能なことを明らかにした。一方、CS 法で同じ反応時間で DNA シークエンス解析を行った場合には、蛍光シグナルの検出が不能で検出限界値以下となり、DNA シークエンス解析は不可能であった（データ省略)。

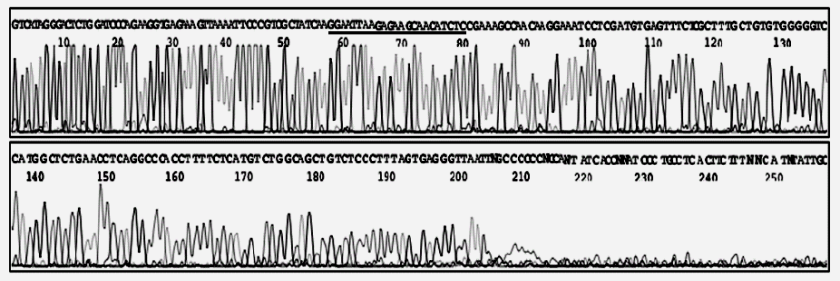

Fig. 6.2 Rapid TS for PCR product.
Detection of deletion by direct TS method. The T7 and T3 phage promoter sequences can be appended to both of the PCR primers and incorporated into the *EGFR* PCR product(281 bp). Using T7 RNAP, the *EGFR* gene could be transcribed from both ends for 5 minutes. The electrophoresis shows only T7 side-sequence of the *EGFR* exon19. The lines show the locations of deletion in NSCLC.

6.3.2. pTS1 ベクターの構築

本章の検討においてはまず、TS 法による DNA シークエンス解析で用いる鋳型 DNA としての使用に適したクローニングベクターの構築を試みた。TS 法で用いる鋳型 DNA には DNA シークエンス解析を行いたい DNA 領域の上流に T7 Promoter を有する必要がある。T7 promoter には T7 ファージの大腸菌への感染および T7 ファージ粒子の構築の過程で働くいくつかの種類があり、それぞれの種類は class I、class II および class III の 3 つに分類される。中でも class III は T7 ファージを構築するための基礎となるタンパク質をコードする遺伝子の発現にかかわるものが多く、3 つの T7 promoter の種類の中で T7 promoter の活性が最強であることが知られている[10]。このため T7 promoter を有する従来のクローニングベクターにおいては class III の T7 promoter において保存されているコンセンサス配列を T7 promoter として用いている。しかしながら、従来のクローニングベクターは class III で保存されている 23 塩基のコンサンサス配列(5'-TAA,TAC,GAC,TCA,CTA,TAG,GGG,AGA-3')の内、-17 から+3 までの領域(5'-TAA,TAC,GAC,TCA,CTA,TAG,GG-3')を T7 promoter 配列として導入しているものが多いが、T7 promoter 配列の転写開始点+1 から+6 の領域における class III のコンセンサス配列からの置換は T7 promoter 活性を低下させることが報告されている[11, 12]。さらに、+4 から+6 位までの領域についても T7 promoter の class III のコンセンサス配列と異なる場合に RNA 合成効率が低下することが報告されており、+4 から+6 の領域の重要性も報告されている[13]。このような報告から推察すると、T7 promoter を持つ従来のクローニングベクターは+4 から+6 の領域において置換されており、本来 T7 promoter が有する promoter 活性が発揮出来ていない可能性もある。クローニングベクターを構築するにあたり、上記以外の要素として T7 promoter を有する従来のクローニングベクターはマルチクローニング部位（MCS）において外来 DNA 断片をクローニングするための様々な制限酵素による切断部位を持つが、本章における pBS を鋳型 DNA に用いた検討によって制限酵素 *Not* I(5'-GCG,GCC,GC-3')のような GC リッチな DNA 配列を有する制限酵素切断部位が MCS に存在する場合には、このような配列を含む DNA を鋳型として T7 RNAP を用いて RNA 合成にした場合に、RNA 合成効率の低下傾向が認められた（データ省略）。以上のような知見を踏まえて Fig. 6.3 に示す MCS の配列を有するクローニングベクター pTS1 を構築し、TS 法において pTS1 の特長と T7 promoter を有する他のクローニングベクターとの比較を行い、その性能を評価した。

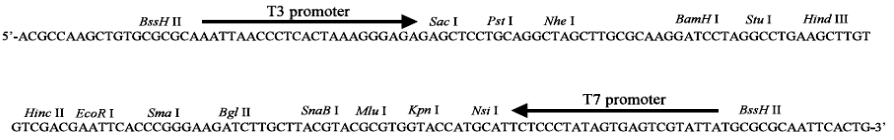

Fig. 6.3 Structure of pTS1 multiple-cloning sites.
Multiple-cloning site flanked by minimum T3 and T7 promoters in pTS1 vector.
Directions of each arrow show directions of transcription.

6.3.3. TS 法と CS 法におけるシークエンス反応時間の比較

本章においては、TS 法のシークエンス反応時間について CS 法との比較実験を行った(Fig. 6.4)。さらに本章実験結果（6.3.2.）において構築したクローニングベクターpTS1 と T7 promoter 配列を有する既存のクローニング用ベクターを鋳型 DNA として用い、TS 法による DNA シークエンス解析におけるシークエンス精度といくつかのシークエンス反応時間で得られた DNA シークエンス解析結果におけるシークエンス精度を比較することで pTS1 の有用性の評価を行った。この検討においては、pTS1 と比較するクローニングベクターとして pBS および pGEM3Zf(pGEM)を用いた。Fig. 6.4 に示す実験結果において、pTS1、pBS および pGEM を鋳型 DNA として DNA シークエンス解析を行った場合、TS 法においてはシークエンス反応時間 5 分の場合にすべての鋳型 DNA 種において 400 塩基までの解読鎖長において 99.5%以上のシークエンス精度で DNA シークエンス解析が行えることが明らかとなった。一方、CS 法ではすべての鋳型 DNA を用いたいずれの条件においても、シークエンス反応時間 5 分でおこなった TS 法の DNA シークエンス解析結果と同等なシークエンス精度を示す DNA シークエンス解析結果が得られたのは、シークエンス反応時間 60 分の条件のみであった。以上の実験結果から TS 法では、シークエンス反応時間を、CS 法のシークエンス反応時間の 8%に短縮可能なことが明らかとなった。

つぎに、TS 法において pTS1、pBS および pGEM を鋳型 DNA として用いて DNA シークエンス解析を行った場合の DNA シークエンス解析結果の比較を行ったところ、シークエンス反応時間 1 分の反応条件においても 99%以上のシークエンス精度での DNA シークエンス解析が可能であり、pBS と pGEM ではそれぞれ 89.5%と 91.0%のシークエンス精度にとどまった。この実験結果から pTS1 ベクターは T7 promoter を持つ従来のクローニングベクターと比較して短いシークエンス反応時間で TS 法を行った場合にシークエンス精度の上昇が可能であり、短時間で DNA シークエンス解析が行える TS 法の特長をさらに向上させる効果が認められた。

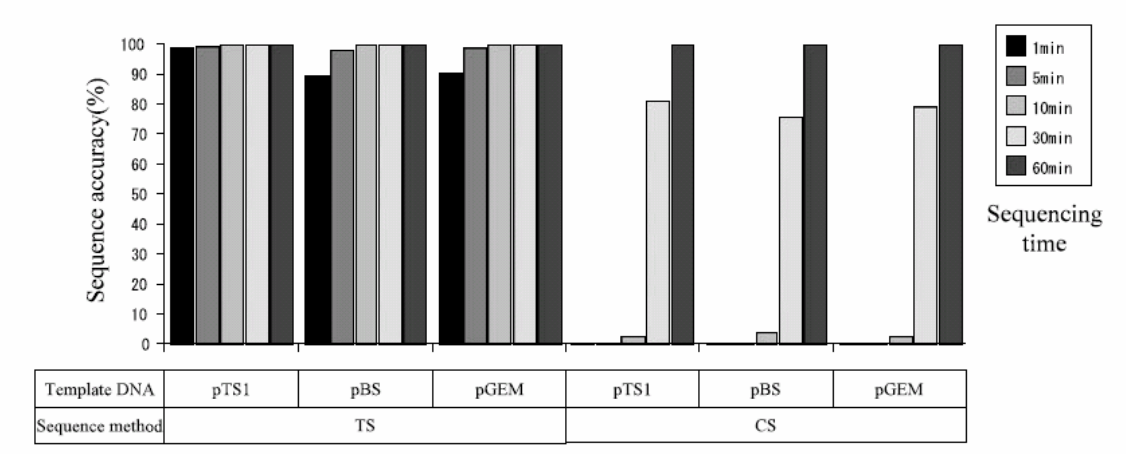

Fig. 6.4 Comparison of sequence accuracy with pTS1 and commercial vectors. Comparison of sequence accuracy within 400 base-long regions of TS and CS by various plasmids, pTS1, pGEM and pBS. 200 ng of each plasmid were incubated for 1, 5, 10, 15 and 30 min using both methods. The individual quality of the sequences was assessed by calculating the percentage of correct basecalls with in 400 base-long sections from the first signal.

6.4. 考察

本章では、TS 法は CS 法と比較して短時間での DNA シークエンス反応が可能であることを明らかにした。本章で明らかとなった同等のシークエンス精度で DNA シークエンス解析を行う場合、CS 法の 60 分と比較して TS 法では 5 分のシークエンス反応時間で十分であることや 5 章において明らかになった未精製の PCR 産物を鋳型 DNA の使用が可能なこと、さらに温調機器の必要が無いなどの特長は、最近の研究で進められている Micro electro mechanical systems (MEMS)技術などによる微細加工技術による DNA シークエンス解析デバイスなどへの応用の面で CS 法の場合と比較して搭載すべき機能が少なくできることから、TS 法を用いた場合にこのようなデバイス開発が促進される可能性を示唆している[14]。

つぎに、本章において構築した pTS1 と従来のクローニングベクターの性能を比較した。pTS1 の優位性は MCS の配列および promoter 配列によることが示唆されたが、promoter 配列に起因すると仮定した場合、T7 RNAP による RNA 合成反応における二つの反応機構、initiation phase および processive elongation phase の違いに関与している可能性がある。initiation phase は T7 promoter の転写開始点から+8 塩基までの領域の RNA 合成反応機構であり、initiation phase は processive elongation phase と比較して伸長速度が遅く、さらに非特異的な転写終結等を起こしやすいことが報告されている[12]。このため転写開

始点から+8塩基までの領域においてT7 RNAPによるRNA合成反応において効率を下げる配列が存在することは最終的に得られるRNA合成産物量に大きく影響を与えることが示唆される。一方、processive elongation phaseに入ったあとは早い伸長速度でRNA合成反応が進行し、このprocessive elongation phaseにおいてはRNA合成効率の低い配列の影響を受けにくいことが示唆される。このためT7 promoterの転写開始点以降の+4から+6の領域のコンセンサス配列からの置換はinitiation phaseにおけるRNA合成反応の進行に影響し、最終的に得られるRNA合成産物の量に顕著に影響を与えることが想定される。

Fig. 6.4の実験結果において、シークエンス反応時間1分の反応条件でTS法を行った場合のシークエンス精度がpBSとpGEMで比較するとpGEMを鋳型DNAとして用いた場合のシークエンス精度が良好であった。pBSとpGEMを用いた場合のシークエンス精度の違いが認められるが、pBSとpGEMの有するT7 promoterは同一であるため、T7 promoterの以外の配列の違いが存在していると考えられる。そこでT7 promoter以外の違いに注目して調べた結果、pBSとpGEMが有するMCSには、G塩基またはC塩基のみで構成された7塩基以上の配列がそれぞれ3箇所と1箇所あることがわかった。この違いがpBSとpGEMを用いた場合のシークエンス精度の違いを引き起こす一因ではないかと考えられる。なお、pTS1のMCSには7塩基以上のG塩基またはC塩基のみで構成されたDNA配列は存在していない。

また、本章で明らかとなったTS法による極めて短時間でDNAシークエンス解析が行うことのできるこの特長は迅速なDNAシークエンス解析が必要な場合において極めて重要と考えられる。一例としてはhuman hepatitis B virus(hHBV)に存在するDNA変異が重症度に関与し、劇症肝炎および急性肝炎の発症に関与していることが知られている[15]。劇症肝炎は急速に肝機能異常が進み、数日から10日前後で肝不全、肝性脳症に至り死亡する予後不良のものである。治療にあたってはHBVの変異を早期に診断することが必要となる。このような早期に診断する必要がある感染症の診断や術中の病理検査などにおいて、TS法による短時間でのDNAシークエンス解析は現場での使用の可能性など用途の拡大をも予想させることから、技術的な優位性とともに実用面でも有用と考えられる。

6.5. 結語

第6章では、TS法とCS法のDNAシークエンス解析におけるシークエンス反応時間の相違についてキャピラリーDNA シークエンサーを用いて評価を行った。TS反応は、37℃の恒温反応であり温調機器が不要なこと、さらにT7 RNAPは*Taq* DNAPと比較して伸長速度が約4倍速いことから、 CS反応と比較して、シークエンス反応時間の顕著な短縮が期待された。この検証を目的に*EGFR* エキソン19遺伝子領域を含むPCR産物やpBS、*pGEM*および本章において構築したTS法

の鋳型 DNA として適した pTS1 の各プラスミド DNA を鋳型として用い、TS 法および CS 法によるシークエンス反応時間の比較を行ったところ、TS 法では、シークエンス反応時間 5 分で 99.5%以上（解読鎖長 400 塩基）のシークエンス精度での解析が可能であった。シークエンス反応時間 5 分では、CS 法では同じシークエンス反応解析は不可能である。以上の検討により、TS 法では、シークエンス反応時間を、CS 法のシークエンス反応時間の 8%に短縮できることを明らかにした。

参考文献

(1) J. G. Paez, P. A. Janne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Tujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson, Science, 304, 1497–1500(2004).

(2) D. L. Lyaknov, B. He, X. Zhang, F. W. Studier, J. J. Dunn, W. T. McAllister, J. Mol .Biol., 280：201–213(1998).

(3) D. L. Lyaknov, B. He, X. Zhang, F. W. Studier, J. J. Dunn, W. T. McAllister, J. Mol. Biol., 269：28–40(1997).

(4) J. A. Luckey, H. Drossman, A. J. Kostichka, D. A. Mead, J. D'Cunha, T. B. Norris, L. M. Smith, Nucleic Acids Research, 18, 4417-4421.

(5) M. L. Metzker, J. Lu, R. A. Gibbs, Science, 271, 1420-1422(1996).

(6) M.A. Innis, K. B. Myambo, D. H. Gelfand, M. A. Brow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 9436-9440(1988).

(7) O. V. Makarova, E. M. Makarova, R. Sousa, M. Dreyfus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 12250-12254(1995).

(8) D. A. Schafer, J. Gelles, M. P. Sheetz, R. Landick, Nature, 352, 444-448(1991).

(9) R. A. Bambara, D. Uyemura, T. Choi, J. Biol. Chem., 253,413-423(1978).

(10) R. A. Ikeda, A. C. Lin, J. Clarke, J. Biol. Chem., 267, 2640-2649(1992).

(11) J.F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, Nucleic Acids Res., 15, 8783-8798(1987).

(12) C. T. Martin, D. K. Muller, J. E. Coleman, Biochem, 27, 3966-3974(1988).

(13) D. Imburgio, M. Rong, K. Ma, W. T. McAllister, Biochemistry, 39, 10419-10430(2000).

(14) E. P. Kartalov, S. R. Quake, Nucleic Acids Res., 32, 2873– 2879(2004).

(15) G. V. Papatheodoridis, S. J. Hadziyannis Clin., J. Viral. Hepat., 8, 311-321(2001).

第7章　TS法を用いた難解読領域のDNAシークエンス解析法の構築

7.1. 緒言

CS法ではシークエンスシグナルの急激な減衰や停止を伴いDNAシークエンス解析が困難なDNA領域（難解読領域）の存在が知られている。このような難解読領域のDNAシークエンス解析を可能とすることを目的として、2本のDNA鎖において対向するGC間とAT間の水素結合形成能を弱める添加剤の使用やシークエンス反応のための温度の変更などが試みられているが、鋳型DNAの配列やGC含有率、読み取り対象のDNAの鎖長の違いなどの要因によって、その対処法は異なり、どの方法も完全ではなく一般的な方法ではなかった。

本章では、上記のような難解読領域のDNAシークエンス解析を可能とする方法として、TS法による難解読領域のシークエンス解析法の構築とその評価を行った。すなわち、CS法でDNAシークエンス解析が困難であったヒトゲノムDNA断片のDNAシークエンス解析をTS法およびCS法を用いて得られた実験結果の比較を行うことにより、難解読領域のDNAシークエンス解析におけるTS法の優位性を評価した。さらに、難解読領域のDNAシークエンス解析法において、難解読領域を有する鋳型DNAの調製方法として、Multiple displacement amplification(MDA)法を用いることによるDNA増幅およびMDA産物のTS法による鋳型DNAとしての使用について検討を行うこととした。

7.2. 実験方法

7.2.1.　TS法を用いた難解読領域のDNAシークエンス解析

TS法を用いた難解読領域のDNAシークエンス解析実験については、以下の反応を用いて行った。反応液として40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2 mM spermidine$(HCl)_3$, 0.4 mM $MnCl_2$、0.05% Tween 20、1 mM GMP, 250 μM ATP, 500 μM ITP, 250 μM CTP, 250 μM 5-Br-UTP, 0.1 μM BODIPY R6G-3'-dATP、0.2 μM BODIPY FL-3'-dGTP、0.4 μM BODIPY 564/570-3'-dUTP、0.3 μM BODIPY-3'-dCTPを調製し、鋳型DNAとして難解読領域を有するヒトゲノムDNA断片をpTS1の制限酵素*Hinc*II切断部位に挿入した環状プラスミドDNA 100 ngを反応液に添加した。この反応液に50 units T7 RNAP変異体delta-F644Yおよび0.005 units PPaseを添加して37℃で1時間反応したのち、終濃度56 mMとなるようにethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)を添加し、99.5%(v/v) EtOHおよび70%(v/v) EtOHを用いてエタノール沈殿を行うことでRNA産物を沈殿させた。沈殿したRNA産物は、Template Suppression Reagent　25 μlに溶解し、ABI Prism 310 Genetic Analyzerを用いて機器添付の取扱説明書に従っ

て電気泳動したのちに泳動結果を解析した。

CS 法については、Big Dye terminator Cycle Sequencing kit ver. 3.0 を用いて、TS 法と同じ鋳型 DNA 量で製品添付の取扱説明書に従って CS 反応および反応産物の精製を行い、ABI Prism 310 Genetic Analyzer を用いて機器添付の取扱説明書に従って、電気泳動したのちに泳動結果を解析した。

得られた DNA シークエンス解析結果は、UCSC Genome Browser(http://genome.ucsc.edu/)を用いて、ヒトゲノム DNA データーベースとの比較を行った。

7.2.2. 難解読領域を有する MDA 産物の TS 法を用いた DNA シークエンス解析

難解読領域を有する MDA 産物および PCR 産物の調製は、以下の方法を用いて行った。まず、MDA 産物の調製は、難解読領域を有するヒトゲノム DNA 断片を pTS1 の制限酵素 *Hinc* II 切断部位に挿入した環状プラスミド DNA を保持した大腸菌のコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて採取した。つぎに Templiphi amplification kit(Amersham Bioscience, Tokyo, Japan)を用い、製品添付の取扱説明書に従って調製した反応液に大腸菌のコロニーを添加し、MDA 反応を行うことで MDA 産物の調製を行った。PCR 産物の調製は、0.1 M PCR プライマー M13 Forward(5'-GTA,AAA,CGA,CGG,CCA,GT-3')および PCR プライマー M13 Reverse(5'-CAG,GAA,ACA,GCT,ATG,AC-3')を用い、0.5 units Ex Taq DNA polymerase(Takara Bio, Shiga, Japan)を添加した反応液に鋳型 DNA サンプルとして MDA 産物の調製の場合と同様に大腸菌のコロニーを爪楊枝を用いて添加し、PCR 反応を行うことにより PCR 産物を調製した。PCR 法に用いるサーマルサイクラーとしては PTC-200 DNA Engine(MJ Research, CA , U.S.A)を使用した。PCR 反応プログラムはまず 94℃で 3 分間の予備変性処理し、94℃で 45 秒、55℃で 45 秒、72℃で 2 分の増幅反応を 30 回繰り返したのちに 72℃で 5 分の後処理を行った。PCR 産物および MDA 産物を鋳型 DNA として CS 法を用いて DNA シークエンス解析する場合には、Exonuclease I および Shrimp alkaline phosphatase (Amersham Bioscience, Tokyo, Japan)を MDA 産物および PCR 産物に添加した。添加したのち、37℃で 30 分の処理に引き続き 80℃で 15 分処理することで PCR プライマーと dNTPs を不活性化して、鋳型 DNA として用いた。MDA 産物と PCR 産物を TS 法を用いた DNA シークエンス解析で鋳型 DNA として用いる場合には、Exonuclease I および Shrimp alkaline phosphatase による不活性化処理は行わず、TS 反応に添加した。

上記の方法により調製した MDA 産物および PCR 産物は、0.8% アガロースゲルを用いた電気泳動により、DNA 増幅の有無を確認した。電気泳動による確認ののち、TS 反応および CS 反応ともに鋳型 DNA 量は同量で反応を行った。TS 反応は反応時間 5 分で行い、CS 反応は 1 時間で行った。TS 反応および CS 反応は本章実験方法(7.2.1)と同様に行った。TS 反応および CS 反応により調製した RNA

産物および DNA 産物は、Centri Sep column を用いてゲルろ過を行うことにより精製した。精製した RNA 産物および DNA 産物は蒸発乾固せずに ABI Prism 310 Genetic Analyzer で取扱説明書に従って電気泳動したのちに泳動結果を解析した。

7.3. 実験結果

7.3.1. 難解読領域の TS 法を用いた DNA シークエンス解析

CS 法を用いた DNA シークエンス解析において、DNA シークエンス解析が困難である難解読領域として、GC リッチな配列、poly G などのポリモノヌクレオチド配列、パリンドローム配列、GT などの塩基配列の繰返しであるジヌクレオチドリピートなどが知られている[1, 2]。このような難解読領域を CS 法により DNA シークエンス解析した場合には、シークエンスシグナルの減衰や消失が生じることにより、DNA シークエンス解析の難しいことが知られているが、この問題は CS 反応中に鋳型 DNA が 1 本鎖 DNA となったことにより生ずると考えられる二次構造による DNAP の伸長反応進行への阻害が原因と考えられる。この問題への対処法として、核酸における水素結合形成を弱める効果のある formamide や dimethyl sulphoxide(DMSO)などの CS 反応への添加[3, 4]や c^7-dGTP、dITP などのヌクレオチドアナログの CS 反応への添加[5]による鋳型 DNA 中の二次構造形成の抑制による対応が試みられているが、いずれの方法を用いた場合でも完全にこの問題を解決することが出来ていない。

しかし、このような難解読領域は、DNA シークエンス解析の必要がない無駄な配列ということではなく、たとえば GC リッチな DNA 領域は遺伝子発現調節機能を有するプロモーターやエンハンサー等の重要な DNA 領域およびその近傍に位置することが多く[6]、エピジェネティックな遺伝子発現制御にも関連する極めて重要な DNA 領域である[7]。また、産業面では、たとえば抗生物質産生菌である放線菌のゲノム DNA は極めて GC リッチな DNA 領域であることが明らかとなっているが、抗生物質の産生機構には不明な部分が多く、新たな抗生物質の創製などにおいて、解読すべき重要な DNA 領域となる[8]。さらに、CS 法を用いた DNA シークエンス解析法を使用して行われている国際ヒトゲノム解析プロジェクトにおいては、DNA シークエンス解析の難しい 341 のギャップ領域の存在を報告している[9]。このようなギャップ領域には、新たな転写単位や遺伝子発現にかかわる重要な遺伝子、さらに疾患に関与する single nucleotide polymorphism(SNPs)などの存在が示唆されており、その解読が待たれているところである[10, 11]。

難解読領域の DNA シークエンス解析において、CS 法を用いた DNA シークエンス解析での問題は、CS 反応において、熱変性により鋳型 DNA が 1 本鎖となるこ

とにより、GC リッチな DNA 配列、ポリモノヌクレオチド配列、ジヌクレオチド配列を有する 1 本鎖 DNA は Fig. 7.1 に示すように二次構造を形成しやすくなり、その結果として強固な二次構造を形成することで DNAP による伸長反応の進行を妨げ、CS 反応が停止することに起因すると考えられる。一方、TS 法は RNAP による伸長反応を利用しており、RNAP は Fig. 1.8 に示すように自らが有する酵素活性によって、2 本鎖である鋳型 DNA を RNAP による伸長反応において最低限必要な領域のみ 1 本鎖とすることにより、CS 法において問題となる二次構造の形成のリスクが少ないと考えられた。

さらに T7 RNAP は、$d(GC)_{16}$ DNA のような Z 型構造を示す DNA を鋳型として RNA 合成できるという報告があり[12]、T7 RNAP 以外でも大腸菌由来 RNAP や小麦由来 RNAP について、d(GC)n のような Z 型構造を示す DNA を鋳型 DNA として反応できるとの報告がある[13]。2 本鎖 DNA は、一般的には B 型構造を示すことが知られているが、Z 型構造を形成しやすい DNA として d(CG)n、d(CA/TG)n、d(TA)n などに加え[14]、d(GGGC)n[15]などの配列を有することが報告されており、これらの配列は CS 法で解析の困難な難解読領域と合致する。加えて、RNAP と鋳型 DNA の elongation complex 形成時に鋳型 DNA が Z 型構造をとっていることも報告されており[16]、Z 型構造を示す DNA は真核生物においてプロモーター配列やその周辺に位置し、転写機構の制御に関与していることも示唆されており[17]、この報告は RNAP と Z 型構造を示す DNA の関与を示唆するものと考えられる。

以上から、TS 法を用いることで、CS 法を用いた難解読領域の DNA シークエンス解析における問題の解消が可能と考え、難解読領域の DNA シークエンス領域における TS 法使用による効果の評価を目的に難解読領域の DNA シークエンス解析を TS 法および CS 法で行い、解析結果の比較検討を行った。

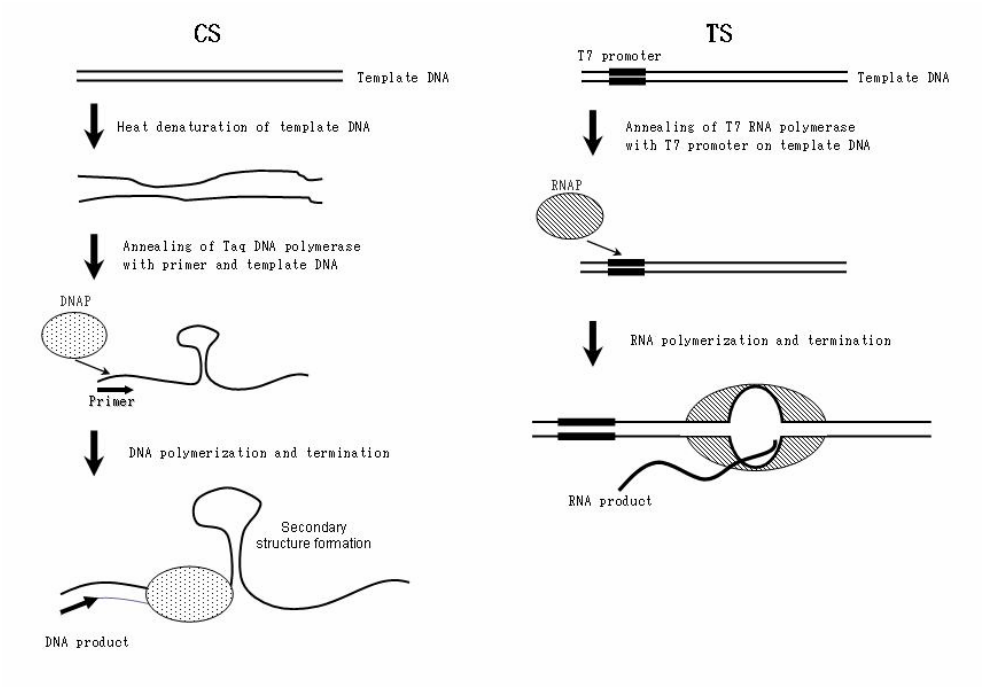

Fig. 7.1 Comparison of TS and CS reaction mechanisms for difficult-to-sequence template.

Fig. 7.2、Fig. 7.3、Fig. 7.4 に示す実験結果は、ヒトゲノム DNA において CS 法を用いた場合に DNA シークエンス解析法が困難であった難解読領域の TS 法および CS 法を用いた DNA シークエンス解析結果である。これらの実験に用いた難解読領域を有する DNA は、国際ヒトゲノムシークエンス解析プロジェクトにおいて、CS 法による DNA シークエンス解析が困難なものとして選択された DNA クローンである。

まず、Fig. 7.2 に示す実験結果は、GC リッチな配列を有するヒトゲノム DNA の DNA シークエンス解析結果を示している。この DNA シークエンス解析結果において、CS 法では GC リッチな領域における図中の矢印で示す部位でシークエンスシグナルが急激に減衰し、その領域以降ではシークエンスシグナルが認められなかった。この結果は、矢印で示す領域の近傍で CS 反応が停止したことを示している。一方、TS 法による解析では、CS 法を用いた DNA シークエンス解析において認められたシークエンスシグナルの急激な減衰は認められず、DNA シークエンス解析が可能であった。

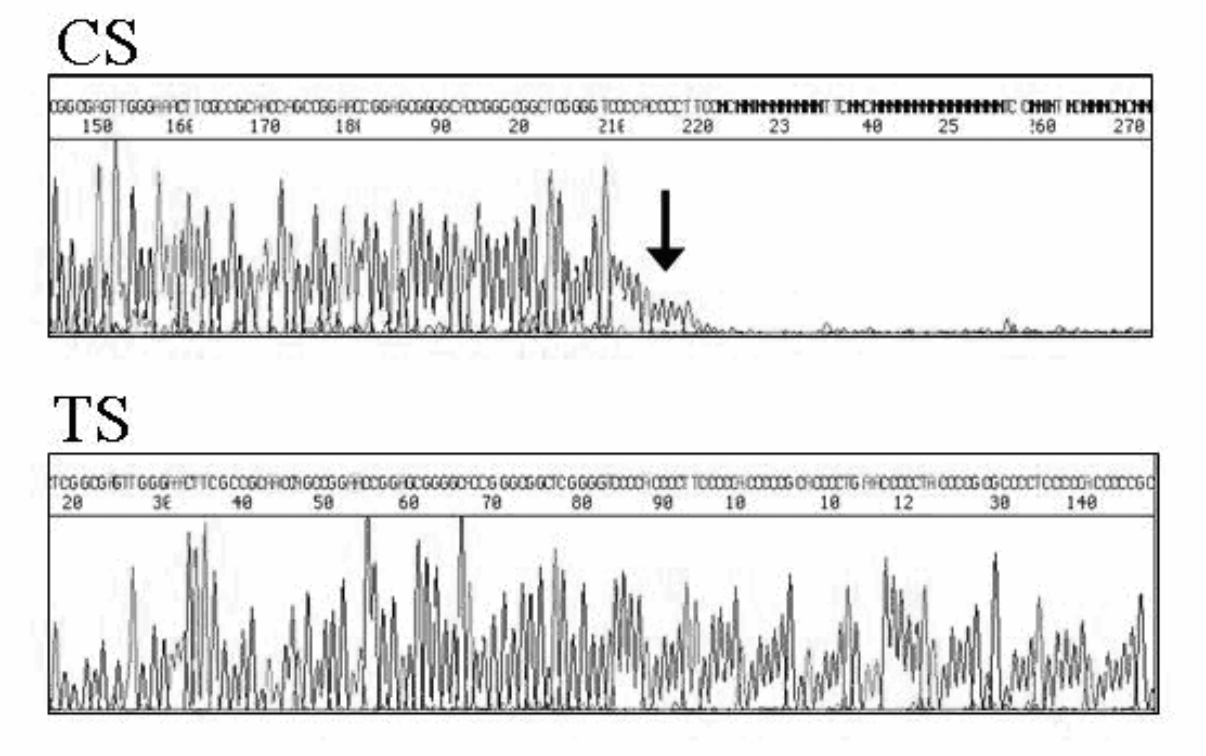

Fig. 7.2 Comparison of sequence analyses by TS and CS methodsfor DNA sequence of GC-rich region.
One GC-rich region picked up from human genomic clones was selected and sequenced by TS and CS methods. The upper and lower panels show electro-pherograms with CS and TS, respectively. Peaks suddenly disappear at the points indicated by arrows in CS.To the contrary, peaks continue beyond the termination points in TS.

つぎに、Fig. 7.3 に示す実験結果は、GT ジヌクレオチドリピート配列の TS 法と CS 法を用いた DNA シークエンス解析結果を示している。この実験結果において、CS 法を用いた DNA シークエンス解析結果では GT ジヌクレオチドリピート配列近傍の矢印で示す領域において、シークエンスシグナルが急激に減衰した。一方、TS 法を用いた場合には CS 法を用いた場合に見られるシークエンスシグナルの急激な減衰は無く、それ以降の領域についても DNA シークエンス解析が可能であった。

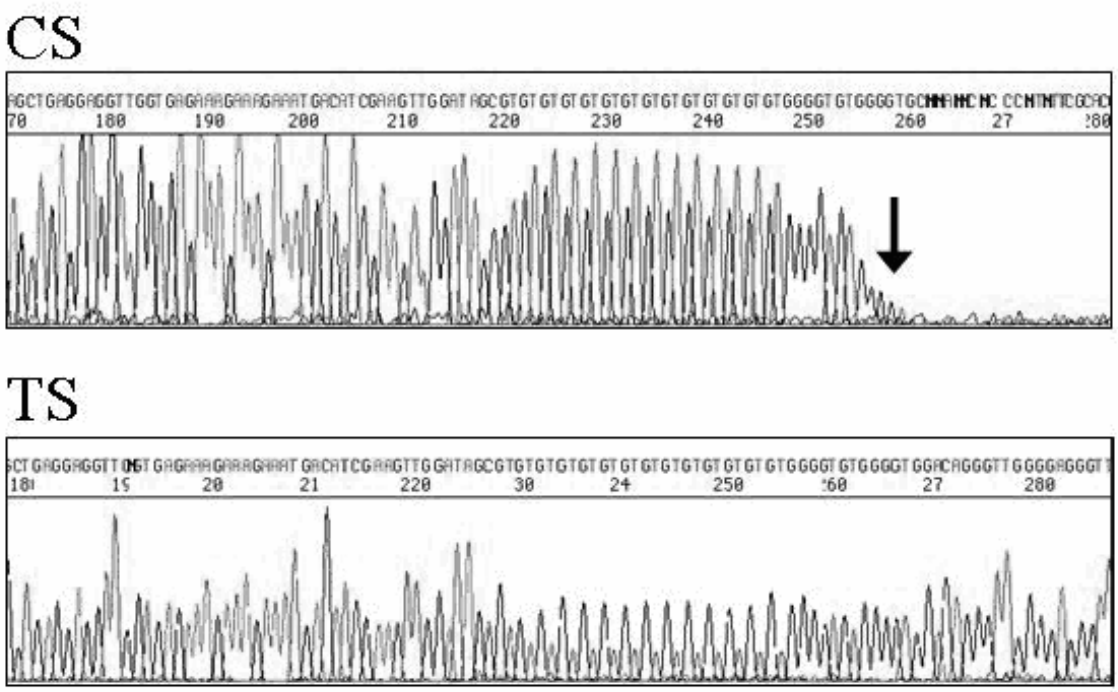

Fig. 7.3 Comparison of sequence analyses by TS and CS methods results for DNA sequence of GT dinucleotide repetitive region.
One GT dinucleotide repetitive region picked up from human genomic clones was selected and sequenced by TS and CS methods. The upper and lower panels show electropherograms with CS and TS, respectively. Peaks suddenly disappear at the points indicated by arrows in CS. To the contrary, peaks continue beyond the termination points in TS.

さらに、Fig. 7.4 に示す実験結果は、poly G 配列の TS 法および CS 法を用いた DNA シークエンス解析結果を示している。この実験結果において、CS 法を用いた DNA シークエンス解析結果では poly G 配列近傍の矢印で示す領域において、シークエンスシグナルが急激に減衰した。一方、TS 法を用いた場合には poly G 配列においてもシークエンスシグナルの急激な減衰は無く、poly G 配列以降の領域についても DNA シークエンス解析が可能であった。

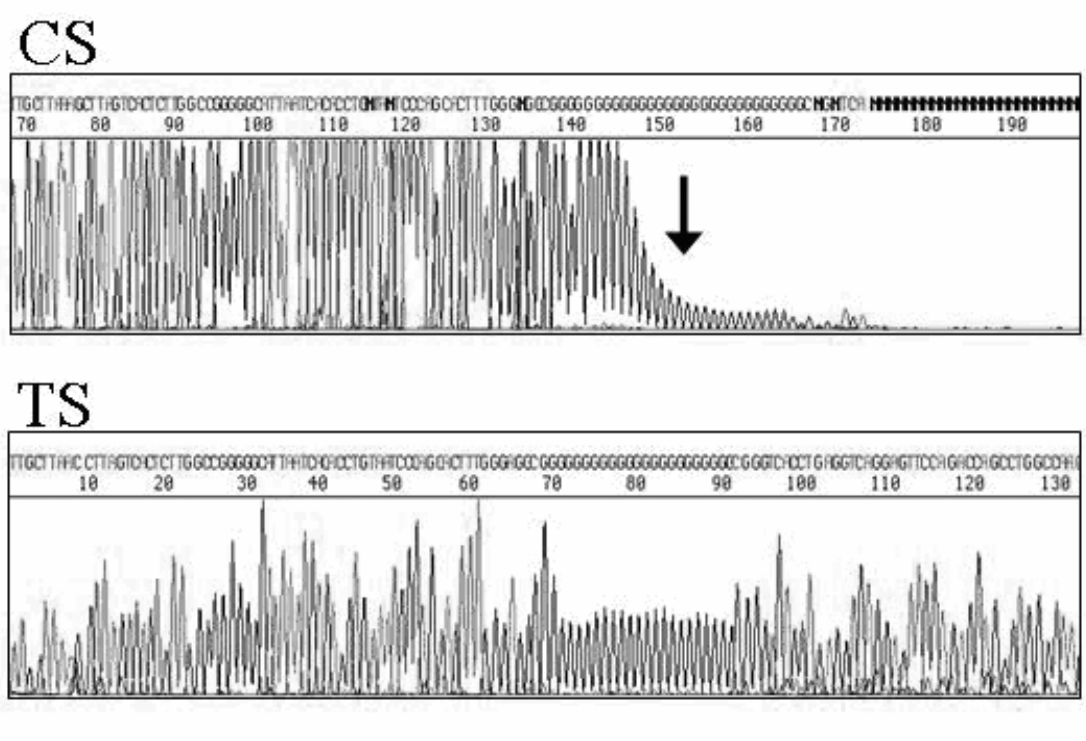

Fig. 7.4 Comparison of sequence analyses by TS and CS methods for DNA sequence of poly G region.
One poly G region pecked up from human genomic clone was selected and sequenced by TS and CS methods. The upper and lower panels show electropherograms with CS and TS, respectively. Peaks suddenly disappear at the points indicated by arrows in CS. To the contrary, peaks continue beyond the termination points in TS.

7.3.2. 難解読領域を有するMDA産物のTS法によるDNAシークエンス解析

本章において、難解読領域のDNAシークエンス解析でのTS法使用の優位性が明らかとなったが難解読領域であるGCリッチな配列を有するDNAは、PCR法によるDNA増幅の難しい領域としても知られている。この問題の解決のためにDMSOやformamideやヌクレオチドアナログのPCR反応への添加[18, 19]および反応温度のサイクルプログラムの変更[20]などによる対処法が報告されているが、完全ではない。TS法を用いた難解読領域のDNAシークエンス解析において、PCR法によるDNA増幅が難しい配列を有するDNAについても、TS法での解析を可能とすることを目的として以下の検討を行った。PCR法でDNA増幅の難しいGCリッチな配列を有するDNAの増幅法の候補として、MDA法を用いて、GCリッチな配列を有するDNAのDNA増幅について検討を行い、MDA法により調製したMDA産物がTS法において鋳型DNAとして使用可能かについての評価を行った。MDA法は、φ29 DNAPを用いたDNA増幅法であり、φ29 DNAPが有する恒温条件での鎖置換活性を利用することで、PCR

法において必要な反応温度変化無しにDNA伸長反応を進行することが可能なDNA増幅法である[21]。MDA法に関してはYan[22]らの報告において、GCリッチな配列を有するDNAのDNA増幅について、PCR法と比較して優位性を示す結果がある。そこで、本章ではこの報告に基づいて、GCリッチな配列を有するDNAのDNA増幅に関してMDA法とPCR法によるDNA増幅結果の相違点を調べ、さらにMDA産物がTS法において鋳型DNAとして用いることが可能かどうかについて検討を行った(Fig. 7.5)。Fig. 7.5に示す実験結果は、ヒトゲノムDNA由来のGCリッチなDNA配列を有する7つのサブクローンを鋳型DNAにして、PCR法およびMDA法によりDNA増幅を行った結果を示している。この実験結果において、PCR法を用いた場合、DNA増幅が確認されないか(Lanes 1、4、6、7)、または副産物の増幅を含む複数のDNA増幅が認められ（Lanes 2、3、5）、目的のDNA断片のみDNA増幅した例はなかった。これらの結果はPCRサイクルを45サイクルまで増加させた場合やDMSOを添加した場合でも改善されなかった。一方、MDA法を使用した場合にはすべてのクローンでDNA増幅が確認された。

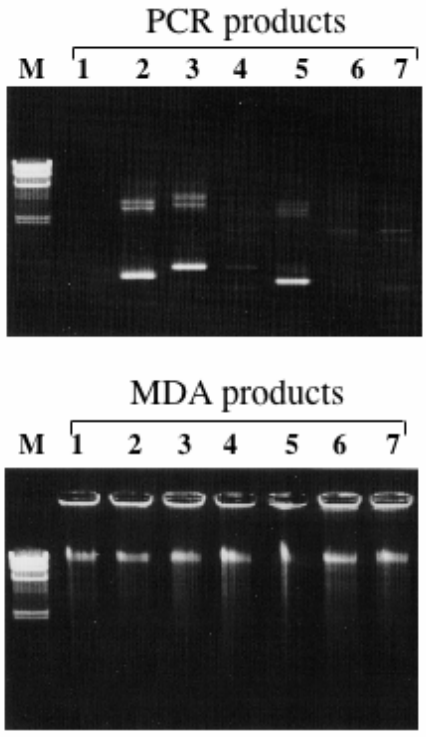

Fig. 7.5 Comparison of DNA amplification patterns by PCR and MDA methods. Template was DNA extracted E. coli clones harboring human chromosome 21 and 11 DNA fragment.Agarose gel electrophoresis of PCR products (upper panel) and MDA products (lower panel) amplified from seven human genomic GC-rich clones. M represents the molecular weight marker. The results show that all fragments can be obtained with a high yield (more than 1 μg DNA in 10 μl of MDA reaction mixture).

つぎにMDA法によるDNA増幅で得られたMDA産物がDNAシークエンス解析の鋳型DNAとして用いることが可能かどうかについて検討を行った(Fig. 7.6)。Fig. 7.6のDNAシークエンス解析結果で示す配列は、GC含有率 82.4%と高い値を示している。Fig. 7.6に示す実験結果からTS法においてMDA産物を鋳型DNAとして使用可能であることが明らかとなった。DNAシークエンス解析結果は、本章(7.3.1)と同様にCS法によるDNAシークエンス解析結果では難解読領域でシークエンスシグナルの急激な減衰が確認され、TS法ではシークエンスシグナルの減衰や消失は認められず、DNAシークエンス解析が可能であった。また、Fig. 7.6に示した実験で用いた以外の鋳型DNAを用いた場合でも、TS法を用いたDNAシークエンス解析により、GC含有率60%から85%の配列を有するDNAのDNAシークエンス解析において、シークエンスシグナルの低下を伴わず、高いシークエンス精度（99.5%以上）でDNAシークエンス解析が可能であった（データ省略）。これらの実験結果から、PCR法によるDNA増幅が難しいGCリッチな配列を有するDNAのDNA増幅がMDA法を用いることにより可能であり、さらにMDA産物はTS法において鋳型DNAとして用いる場合に精製操作を行わず、鋳型DNAとして使用可能であることが明らかとなった。以上より、TS法を用いた難解読領域のDNAシークエンス解析においてMDA法が適したDNA増幅法であることを明らかにした。

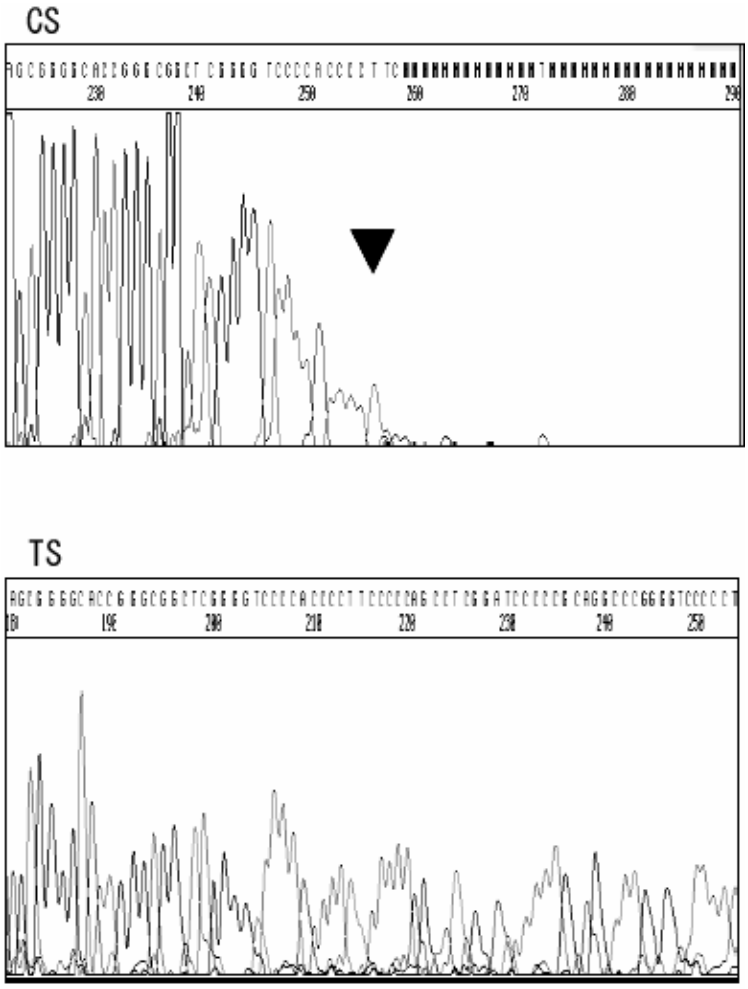

Fig. 7.6　DNA sequencing electropherogram of a highly GC-rich MDA product using CS and TS.
Sample No. 2 of MDA reaction in Fig. 7.5 was subjected to direct-sequencing using CS (upper panel) and TS (lower panel). CS yielded a greatly reduced signal and finally became unreadable. In contrast to the results, all MDA clones could be analyzed completely by TS (data not shown).

本章の結果を総括して、TS法を用いることにより、これまで難解読とされていたDNA領域のDNAシークエンス解析が可能であり、CS法では困難であった難解読シークエンス解析において、その優位性を明らかにした。
本章における TS 法を用いた難解読領域の解析法を用いることで未知の遺伝子の発見や疾患遺伝子の探索、微生物の産業利用等において、有用な遺伝子情報が得られるものと考えられる。

7.3.3.　TS法による難解読DNAシークエンス解析の応用

本章(7.3.1)で解析したヒトゲノムDNAクローンのDNAシークエンス解析結果

を用いて、ヒトゲノム DNA クローンのヒト染色体上の位置と DNA シークエンス解析結果のシークエンス精度を最新版のヒトゲノムシークエンスデーターベースを用いて確認したところ、これらの DNA クローンはヒト染色体 11 番の長腕に位置する DNA 断片であることが確認され、それぞれ q12.2、q25、q24.2 に位置し、400 塩基の解読鎖長で 100%の相同性を示すことが確認できた(データ省略)。q12.2 および q25 に位置した DNA 領域は、これまでのところ遺伝子機能についての報告はなされていないが、q24.2 に位置した DNA 領域は、FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1(FOXRED1)遺伝子のエキソン 8 と 9 の間に存在するイントロン領域に位置していることが確認された。この結果から、TS 法を用いた難解読 DNA シークエンス解析は高精度に DNA シークエンス解析が行えるものであることが、この結果から示された。

さらに、本研究により開発した TS 法を用いた DNA シークエンス解析技術は現在、研究段階から実用化段階に移行しており、上記のような知見以外に、実用化した TS 法を用いた難解読シークエンス解析の一例として、Table 7.1 に示す報告がなされている。まず、様々な生物種のゲノム DNA 解析において、CS 法で DNA シークエンス解析が困難であったため、難解読領域として残ったギャップ領域の解読例が報告されている。たとえば、病原性放線菌 *Nocardia farcinica* IFM10152[23]ゲノム DNA やロドコッカス属細菌 *Rhodococcus eryhtropolis* ゲノム DNA[24]のギャップ領域、ハナタバコ *Nicotiana sylvestris* および *Nicotiana tomentosiformis* ゲノム DNA に存在する短いインバートリピート配列[25]、ミドリムシ *Euglena gracilis* ゲノム DNA の fibrillarin 遺伝子領域近傍に位置するリピート配列[26]などが TS 法を用いることにより解読されたことが報告されている。ゲノム DNA 以外では、レタス *Lactuca sativ*a および *Lactuca Cisco* の plastids のギャップ領域の解読の報告もなされている[27]。

つぎに、CS 法で難解読領域となっていたヒト Neurofibromatosis type 1(NF1)遺伝子に存在するパリンドロームな AT リッチリピート(Palindromic AT-rich repeat, PATRR)配列の DNA シークエンス解析が、TS 法を用いることにより可能となることが報告されている[28]。NF1 遺伝子の PATRR 配列は常染色体優性遺伝病である神経線維腫症 Neurofibromatosis の発症に関与する染色体の転座部位として知られている。また、PATRR 配列は、一般的にヒトゲノム DNA において転座に関与する配列として知られており、加えて CS 法を用いた DNA シークエンス解析が困難である DNA 領域である。

さらに疾患発症に関する例として、男性における脱毛症発症に関与する Androgen receptor 遺伝子のエキソン 1 に存在する GGC 塩基の反復配列について、22 回以上の 3 塩基反復配列の場合は、CS 法を用いることによる DNA シークエンス解析が難しいが、TS 法を用いることにより DNA シークエンス解析が可能であり、TS 法を用いることにより反復回数が正確に判定できたことが報告されている[29]。このような 3 塩基反復配列は一般的には、トリプレットリピートと

呼ばれているが、筋緊張性ジストロフィーや脆弱X症候群のような遺伝性神経疾患にも関与していることが広く知られている[30、31]。たとえば脆弱X症候群(Fragile X syndrome)の場合には、疾患の原因遺伝子として同定されているFragile X mental retardation-1(FMR-1)遺伝子の5'上流領域にCGG塩基の反復配列が存在し、Fragile X syndrome患者では劇的に反復回数が多くなっている。反復回数の増大はFMR-1遺伝子の発現を抑制し、このためFragile X syndromeを発症すると考えられている。加えて反復回数の数による疾患の診断も行われている。Fragile X syndromeの例のようなCGG塩基の反復配列も反復回数が増えるとGCリッチなDNA配列となり、CS法での解析は困難であると考えられるが、TS法を用いることにより解読が可能であると考えられる。

Table 7.1 DNA sequence analyses by TS method for difficult-to-sequence template.

DNA origin	The type of difficult -to-sequence template	Reference
Nocardia farcinica IFM10152	Gap region of genomic DNA	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101, 14925-14930 (2004)
Rhodococcus eryhtropolis	Gap region genomic DNA	Environ. Microbiol., 8, 334-336(2006)
Nicotiana sylvestris, *Nicotiana tomentosiformis*	Invert repeat of genomic DNA	Mol. Gen. Genomics, 275, 367-373(2006)
Euglena gracilis	Repeat region at the vicinity of Fibrillarin gene	Nucleic Acids Res., 33, 2781-2791(2005)
Lactuca Cisco	Gap region of plastids DNA	Trans. Res., 15, 205 -217(2006)
Human	Palindromic AT-rich repeat of Neurofibromatosis type1 gene	Hum. Mut., 26, 332-342 (2005)
Human	GGC triplet repeat of Androgen receptor gene	J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 10, 293 -294(2005)
siRNA expression vector	siRNA region of Krüppel -like factor(KLF5)gene	J. Biol. Chem., 280, 12867-12875(2005)

以上のように、TS法を用いることによりCS法でDNAシークエンス解析が難しい多様な難解読配列の解読が可能であることが明らかとなっており、現在の

ところ未知となっているDNA領域のDNAシークエンス解析や疾患の関連遺伝子の探索および疾患の遺伝子診断等において、従来法と比較して効率良くかつ迅速に診断を行える可能性が示唆される。

7.4. 考察

本章では、TS法を用いた難解読領域のDNAシークエンス解析法の構築について検討した。すなわち、難解読領域のDNAシークエンス解析においてCS法を用いてDNAシークエンス解析した場合に、難解読領域においてシークエンスシグナルの急激な減衰を伴い、難解読領域部分およびそれ以降のDNAシークエンス解析が困難になることがある。しかし、TS法を用いた場合には、このような難解読領域において、シークエンスシグナルの減衰および消失はなく、DNAシークエンス解析を行うことが可能であることが明らかとなった。TS法で難解読領域が解析できる理由は、Fig. 7.1に示すように、CS反応中に形成される鋳型DNAの二次構造形成が、TS反応では形成される可能性が低いことによると考えられる。TS反応で用いているT7 RNAPは伸長反応中にT7 RNAP自身が有する酵素活性によって、2本鎖DNAを1本鎖DNAに解離し、RNA合成反応ののち、再度巻き戻されて2本鎖DNAとなる。このRNA合成反応においては、T7 RNAPにより形成された1本鎖DNAと相補的な配列を有するRNA産物が合成されることになる。その際、鋳型DNAと合成されたRNA産物が水素結合を介してDNA・RNA hybridを形成している鎖長は約7塩基と短く[32]、伸長反応の進行に伴い、DNA・RNA hybridが解離したのちに速やかに鋳型DNAは巻き戻されて2本鎖DNAとなる。さらに、DNA・RNA hybridと鋳型DNAはT7 RNAPタンパク質とも相互作用することでelongation complex(EC)を形成している。ECの形成によって、鋳型DNA中の二次構造形成が抑制されていると考えられる。以上のような理由により、難解読領域のDNAシークエンス解析において、TS法の優位性が発揮されていると考えられる。

TS法は、ゲノムDNAやcDNAのDNAシークエンス解析における難解読領域の解析のみならず、以下に示すsiRNAの発現ベクターのDNAシークエンス解析において、その有用性が認められている。siRNAは21 mer程度の短い2本鎖RNAであり、RNAiとよばれる遺伝子発現を抑制する現象を用いて、遺伝子発現の抑制を行う実験に用いられるものである。この方法はマウス個体などを用いた遺伝子のノックアウト法よりも簡便かつ安価に標的遺伝子のノックアウトを行うことが可能なことから、近年、広く用いられているものである[33]。この方法では化学合成法や酵素合成法により調製したsiRNAの他に、標的遺伝子を発現している細胞内でsiRNAを発現できるsiRNAの発現ベクターも用いられる。発現ベクターに挿入されているsiRNAをコードするDNA領域は、パリンドローム配列となっており、パリンドローム構造によって分子内で2本鎖を形成すること

により、siRNAを合成できるものである。siRNAをコードする配列中に、もし予期しない点変異などが実験過程などで導入された場合、生理活性のないsiRNAが最終的に形成されることになり問題である。このような理由から、siRNA発現ベクターのDNAシークエンス解析が必要であるが、CS法ではパリンドローム配列もGCリッチな配列やリピート配列と同様にDNAシークエンス解析が難しく、このようなsiRNA発現ベクターのDNAシークエンス解析が困難であることが報告されている[34]。このようなsiRNA発現ベクターのDNAシークエンス解析をTS法を用いて行った場合、シークエンスシグナルの減衰なく、DNAシークエンス解析が行えることが実験結果により明らかとなっている(データ省略)。siRNA発現ベクターのTS法を用いた解析例については、Zn finger型の転写因子Krüppel-like factor(KLF15)の遺伝子を標的にしたsiRNA発現ベクターのDNAシークエンス解析例の報告がなされている[35]。

本章で示した実験結果においては、MDA法はGCリッチな配列を有するDNAのDNA増幅において、PCR法と比較して優位性を示したが、MDA法と同様に恒温条件下で鎖置換活性を有するDNAPを用いたDNA増幅法であるLoop-mediated isothermal amplification(LAMP)法[36]やStrand displacement amplification(SDA)法[37]を用いた場合でも同様の効果を示す可能性がある。

本章までの研究成果によって、TS法の開発に成功し、CS法の問題点を解決し、CS法を凌駕するDNAシークエンス解析法であることを明らかにした。

本研究論文は、新規なDNAシークエンス解析法の開発を行い、その成果をまとめたものであるが、近年のDNAシークエンス解析技術開発[38]において有望な技術として、パイロシークエンス法が注目されている。なお、パイロシークエンス法以外のDNAシークエンス解析法についても研究開発が進められているが、現在のところ研究段階であり、解読鎖長が50塩基以下のものがほとんどであるなど、実用化には至っていないのが現状である[39]。パイロシークエンス法は、ジデオキシ法のような電気泳動による分離が必要なく、DNAPによる伸長反応の副産物として生じたピロリン酸をATPに変化させ、luciferaseによる発光反応を利用することでDNAシークエンス解析を行う[40、41]方法である。さらにパイロシークエンス法を応用したDNAシークエンス解析システムの開発が2005年に報告され[42]、このDNAシークエンス解析システムを用いることにより、数百万塩基のDNAシークエンス解析結果が1回の解析で得られることから、安価に大量のDNAシークエンス解析結果を得ることができる。このような利点から、このDNAシークエンス解析システムは大規模なSNPs探索やゲノムDNAの大規模DNAシークエンス解析などに用いられている。しかし、この方法は一反応あたりの解読鎖長が約100塩基とCS法やTS法の解読鎖長の約400～500塩基と比較して顕著に短いという難点があり、解読鎖長が短いことに起因してリピート配列やギャップ領域のDNAシークエンス解析を行うことが困難である。また、5塩基以上のホモポリマー配列では、塩基数を定量することが技術的に容易では

なく、ホモポリマーのDNAシークエンス解析を行うことが困難との問題もある[38]。パイロシークエンス法にはこれらの大きな問題点があり、TS法と同様な難解読DNAシークエンス解析を行うことが困難で、現在のDNAシークエンス解析技術においてはTS法が難解読シークエンス解析法としてもっとも優れた方法であると考えられる。また、パイロシークエンス法はCS法と比較してエラー率が高いという報告もあり[42]、加えて鋳型DNAの前処理として数百塩基程度への断片化が必要なことやemulsion PCRと呼ばれる油水エマルジョン中でのPCR反応を行うためにクリーンルームのような管理された実験環境で行う必要があるなど、シークエンス精度や簡便性にも問題がある[42]。以上より、ジデオキシ法とパイロシークエンス法は大規模なDNAシークエンス解析プロジェクトにおいては、相互に補完的な技術と考えられている[43]。一方、遺伝子診断などの分野では今後もジデオキシ法が中心的な役割を果たしていくと考えられ、TS法についても難解読DNAシークエンス解析のみならず、迅速なDNAシークエンス解析に有用なDNAシークエンス解析法として用いられると考えられる。

7.5. 結語

CS法ではシグナルの急激な減衰や停止を伴いDNAシークエンス解析が困難なDNA領域（難解読領域）に関して、TS法によるDNAシークエンス解析とその評価を行った。難解読領域であるGCリッチなDNA領域は、遺伝子発現調節機能を有するプロモーターやエンハンサー等の重要なDNA領域およびその近傍に位置することが多い。さらに、産業面では、たとえば抗生物質産生菌である放線菌のゲノムDNAは極めてGCリッチなDNA領域であり解読すべき重要なDNA領域である。本章においては、CS法で解析が困難であったヒトゲノムDNA由来のDNA断片のDNAシークエンス解析をTS法によって行い、GC含有率80%以上のDNA領域やGTリピート領域などについて、シグナル停止等を伴わず、高いシークエンス精度での解析が可能であることを明らかとしTS法の優位性を示した。

また、GCリッチな配列を有するDNAのDNA増幅に適しているMDA法を用いたMDA産物を精製無しに直接、TS法において鋳型DNAとして用いることが可能であり、TS法を用いたDNAシークエンス解析法において有用なDNA増幅法であることを明らかにした。

参考文献

(1) J. M. Keith, D. A. E. Cochran, G. H. Lala, P. Adams, D. Bryant, K. R. Mitchelson, Nucleic Acids Res., 32, e35(2004).
(2) J. Kieleczawa, J. Biomol. Tech., 17, 207-217(2006).
(3) W. Zhang, G. Hu, A. B. Deisseroth, Nucleic Acids Res., 19, 6649(1991).

(4) T. M. Scheidl, Y. Miura, H. A. Yee, T. Tamaoki, Biotechniques, 19, 691-693(1995).
(5) M. Motz, S. Paabo, C. Kilger, Biotechniques, 29, 268-70(2000).
(6) S. H. Cross, V. H. Clark, A. P. Bird, Nucleic Acids Res., 27, 2099-2107(1999).
(7) G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, Nature, 429, 457-463(2004).
(8) H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, S. Omura, Nature Biotech., 21, 526-531(2003).
(9) International Human Genome Sequencing Consortium, Nature, 431, 931-945(2004).
(10) E. E. Eichler, R. A. Clark, X. She, Nature Reviews, 5, 345-354(2004).
(11) T. J. Hudson, Nature Genetics, 33, 439-440(2003).
(12) P. Droge, F. M. Pohl, Nucleic Acids Res., 19, 5301-5306(1991).
(13) R. Durand, C. Job. D. A. Zarling, M. Teissere, T. M. Jovin, D. Job, EMBO J., 2, 1707-1714(1983).
(14) A. Rich, A. Nordheim, A. H. Wang, Annu. Rev. Biochem., 53, 791-846(1984).
(15) A. Herbert, A. Rich, J. Biol. Chem., 271, 11595-11598(1996).
(16) L. F. Liu, J. C. Wang, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 7024-7027(1987).
(17) G. P. Schroth, P. J. Chou, P. S. Ho, J. Biol. Chem., 267, 11846-11855(1992).
(18) S. L. Turner, F. J. Jenkins, Biotechniques, 19, 48-52(1995).
(19) W. Henke, K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr, S. A. Loening, Nucleic Acids Res., 25, 3957-3958(1997).
(20) K. H. Hecker, K. H. Roux, 20, 478-485(1996).
(21) F. B. Dean, J. R. Nelson, T. L. Giesler, R. S. Lasken, Genome Res., 11, 1095-1099(2001).
(22) J. Yan, J. Feng, S. Hosono S. Sand, S. S. Sommer, Biotechniques, 37, 136-143(2004).
(23) J. Ishikawa, A. Yamashita, Y. Mikami, Y. Hoshino, H. Kurita, K. Hotta, T. Sshiba, M. Hattori, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101, 14925-14930(2004).
(24) M. Sekine, S. Tanikawa, S. Omata, M. Saito, T. Fujisawa, N. Tsukatani, T. Tajima, T. Sekigawa, H. Kosugi, Y. Matsuo, R. Nishiko, K. Imamura, M. Ito, H. Narita, S. Tago, N. Fujita, S. Harayama, Environ. Microbiol., 8, 334-346(2006).
(25) M. Yukawa, T. Tsudzuki, M. Sugiura, Mol. Gen. Genomics, 275, 367-373(2006).
(26) A. G. Russell, Y. Watanabe, J. M. Charette, M. W. Gray, Nucleic Acids

Res., 33, 2781-2791(2005).
(27) H. Kanamoto, A. Yamashita, H. Asao, S. Okumura, H. Takase, M. Hattori, A. Yokota, K. Tomizawa, Trans. Res., 15, 205-217(2006).
(28) H. Inagaki, T. Ohye, H. Kogo, K. Yamada, H. Kowa, T. H. Shaikh, B. S. Emanuel, H. Kurahashi, Hum. Mut., 26, 332-342(2005).
(29) N. Wakisaka, Y. Taira, M. Ishikawa, Y. Nakamizo, K. Kobayashi, M. Uwabu, Y. Fukuda, Y. Taguchi, T. Hama, M. Kawakami, J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 10, 293-294(2005).
(30) R. Krahe, M. Eckhart, A. O. Ogunniyi, B. O. Osuntokun, M. J. Siciliano, T. Ashizawa, AM. J. Hum. Genet., 56, 1067-1074(1995).
(31) H. A. Lubs, J. Hum. Genet., 21, 231-244(1969).
(32) S. S. Sastry, J. E. Hearst, J. Mol. Biol., 221, 1091-1110(1991).
(33) P. A. Sharp, Genes and Dev., 13, 139-141(1999).
(34) D. C. Ducat, F. J. Herrera, S. J. Triezenberg, Biotechniques, 34, 1140-1144(2003).
(35) T. Mori, H. Sakaue, H. Iguchi, H. Gomi, Y. Okada, Y. Takashima, K. Nakamura, T. Nakamura, T. Yamauchi, N. Kubota, T. Kadowaki, Y. Matsuki, W. Ogawa, R. Hiramatsu, M. Kasuga, J. Biol. Chem., 280, 12867-12875(2005).
(36) T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase, Nucleic Acids Res., 28, e63(2000).
(37) G. T. Walker, M. C. Little, J. G. Nadeau, D. D. Shank, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 392-396(1992).
(38) M. L. Metzker, Genome Res., 15, 1767-1776(2005).
(39) E. Y. Chan, Mutat. Res., 573, 13-40(2005).
(40) M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen, P. Nyren, Anal. Biochem., 242, 84-89(1996).
(41) M. Ronaghi, Genome Res., 11, 3-11(2001).
(42) M. Margulies, M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Goodwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L.I. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley, J. M. Rothberg, Nature, 437, 376-380(2005).
(43) S. M. D. Goldberg, J. Johnson, D. Busam, T. Feldblyum, S. Ferriera,

R. Friedman, A. Halpern, H. Khouri, S. A. Kravitz, F. M. Lauro, K. Li, Y. Rogers, R. Strausberg, G. Sutton, L. Tallon, T. Thomas, E. Venter, M. Frazier, J. C. Venter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 103, 11240-11245(2006).

第 8 章　総括

DNA シークエンス解析について、1977 年にジデオキシ法がサンガーらによって開発された。現在は耐熱性 DNA polymerase を用いたサイクルシークエンス(CS)法がその主流となっており、学術研究における利用のみならず、臨床診断分野にも広く利用されている。しかし、CS 法には以下に示すように解決すべき問題点がある。第一に、PCR 産物の DNA シークエンス解析を行う場合、PCR 産物中の deoxyribonucleic acid triphosphate (dNTP)や PCR プライマーの不活性化が必要であるが、この操作は処理時間の増加に加え、煩雑かつコスト増の要因となっている。また、PCR 産物中には未反応の dNTP や PCR プライマーが残存し、正確なシークエンス解析を困難にする要因となっている。第二に、CS 法は原理上必ず専用機器による温度変化を必要とするため、温度変化に伴う時間的ロスが大きく、反応時間の大幅な短縮が困難である。第三に、CS 法を利用して DNA シークエンス解析を行った場合、GC 含量が多い（GC リッチな）DNA 領域などは解読不能となることが多い。以上を背景として、CS 法とは原理が異なる新規な DNA シークエンス解析の方法と技術が求められていた。

本論文においては、大腸菌ファージ T7 由来の T7 RNA polymerase（T7 RNAP）を用いた *in vitro* 転写反応をジデオキシ法へ応用し、CS 法の持つ問題を解決する新規な DNA シークエンス解析法としての「転写シークエンス（TS）法」の開発を目的として研究を行い、その成果をまとめた。具体的には、T7 RNAP によりジデオキシ反応を行うために必要な蛍光標識 3'-deoxynucleoside triphosphate（蛍光ターミネーター）の開発と蛍光ターミネーターの取り込み活性が上昇した T7 RNAP 変異体の開発を行い、TS 法の効率的な実施に必要な試薬類の開発に成功した。さらに、未精製 PCR 産物が解析できること、CS 法と比べ反応時間の大幅な短縮ができること、GC リッチな DNA 領域の DNA シークエンス解析が可能なことを示し、CS 法を凌駕する新規方法としての TS 法の特長を示した。

第 1 章では、CS 法による DNA シークエンス解析法の原理を概説することにより、解決すべき問題点を明らかにして、本研究の意義と目的を明らかにした。

第 2 章では、本研究で用いた主な実験方法について説明した。すなわち、プラスミド DNA の抽出、DNA シークエンス解析方法、PCR などによる遺伝子増幅方法などについて記述した。

第 3 章では、T7 RNAP の基質として認識可能な蛍光ターミネーターの開発を行った。蛍光ターミネーターは、T7 RNAP の基質として認識され、RNA 鎖に取り込まれた場合、DNA polymerase の場合の ddNTP と同様に、反応終結を引き起こすものである。蛍光ターミネーターとして、DNA シークエンサーにおいて異なる蛍光として検出可能である 4 種の蛍光体 6-carboxy tetramethyl rhodamine（TMR)、6-carboxy X-rhodamine(ROX)、5-carboxy rhodamine6G(R6G)、5-carboxy

rhodamine110(R110)を 3'-dUTP、3'-dCTP、3'-dATP、3'-dGTP にそれぞれ付加した TMR-3'-dUTP(Dye-U)、ROX-3'-dCTP(Dye-C)、R6G-3'-dATP(Dye-A)，R110-3'-dGTP(Dye-G)の構築を行った。構築した蛍光ターミネーターが、T7 RNAP の基質となりうるのかどうかについて、T7 RNAP を用いた *in vitro* 転写反応へ蛍光ターミネーターを添加し、RNA 産物由来の蛍光シグナルを DNA シークエンサーで検出することにより検討した。Dye-U および Dye-G では、シークエンスシグナルが検出されたが、Dye-A および Dye-C では検出されなかった。これらの結果は、蛍光物質に起因する何らかの立体障害によって T7 RNAP の転写反応の阻害が起こったことを示唆した。そこで、3'-dNTP と蛍光物質間のリンカーであるメチレン鎖 (CH_2) 長を $(CH_2)_1$ から $(CH_2)_4$ に変更したところ、Dye-A(n=4)と Dye-C(n=4)の両者に、分離したシークエンスシグナルが検出された。以上より、TS 法に適した蛍光ターミネーターの開発に成功した。

第４章では、3'-dNTP の取り込みに関与する T7 RNAP のアミノ酸残基を特定することにより、各蛍光ターミネーターの取り込みが改善した T7 RNAP 変異体を構築した。第３章の検討では、蛍光ターミネーター由来の蛍光シグナルが弱いことによるシークエンスエラーがしばしば認められた。この原因として、T7 RNAP の示す 3'-dNTP と NTP に対する基質特異性の違いにより、NTP と比較して、効率よく蛍光ターミネーターが取り込まれていないことが推測された。そこで、T7 RNAP の polymerase ドメインにおいて、NTP 結合に関与する部位と考えられる領域およびその近傍に位置する６つのフェニルアラニン残基を選択し、3'-OH 基との相互作用部位の候補とした。つぎに、各フェニルアラニン残基のチロシン残基への置換により、3'-dNTP との相互作用を形成させる点変異体遺伝子を構築し、大腸菌におけるタンパク質発現系を用いて、酵素標品を得た。得られた各酵素標品を用い、*pBluescript*(pBS)DNA 由来の線状 DNA を鋳型とした[α-^{32}P]UTP 存在下での 3'-dATP を添加した *in vitro* 転写反応を行った。生成した RNA 産物中の放射活性を測定し、3'-dATP の取り込みについて、酵素種間の違いを評価した。T7 RNAP F644Y および F667Y を用いた場合、野生型 T7 RNAP を用いた場合と比較して、放射活性の値が約 20%にそれぞれ減少することを見出した。また、この事実は、F644Y および F667Y の 3'-dATP の取り込み活性が野生型 T7 RNAP と比較して上昇したことを示唆した。そこで、F644Y を用いて環状 pBS DNA を鋳型とし、50 μM 3'-dATP を添加して *in vitro* 転写反応を行ったところ、野生型 T7 RNAP よりも優位に転写終結し、取り込み効率の顕著な上昇を示した。さらに TS 法においても、F644Y および F667Y の使用により、蛍光ターミネーター由来のシークエンスシグナルが上昇し、シークエンスエラーが減少し性能的に改善されたことを確認した。

第５章では、TS 法による DNA シークエンス解析において、シークエンスピークの重なりによるシークエンスエラーが確認されたことを受けて、その解消を目的として検討を行った。シークエンスエラーについては、RNA 分子内の二次

構造が、電気泳動中に形成されることにより、分子量による分離が困難になるためと考えられた。そこで、核酸分子内においては、guanosine triphosphate（rGTP）と比較して、水素結合を介した二重鎖形成能が弱い inosine triphosphate（rITP）や 7-deaza-guanosine triphosphate（c^7-rGTP）を rGTP と置換することで、二次構造の解消を試みた。λファージゲノム DNA 断片およびほ乳類由来の cDNA 断片を有するサブクローンを用いてその効果を調べ、シークエンスエラーの解消を確認した。さらに、c^7-rGTP を使用して、ヒト大腸がん細胞株 HT29 の p53 遺伝子配列を有する PCR 産物中に存在する点変異(R274H)の正確な解析が可能となった。同時に、この解析を通じて、未精製の PCR 産物の DNA シークエンス解析なことを明らかにした。また、TS 法および CS 法において鋳型 DNA 量とシークエンス精度との関係を調べ、DNA 量がわずかな場合でも TS 法による解析結果は CS 法よりも優れたシークエンス精度を示すことを明らかにした。一例として、1,8-diaminooctane の使用により、10 ng の微量な DNA からも高いシークエンス精度による解析が可能となった。

第 6 章では、TS 法と CS 法のシークエンス反応時間について評価を行った。TS 反応は、37℃の等温反応のため、温調機器が必要なく、さらに、T7 RNAP は、*Taq* DNA polymerase と比較して伸長速度が約 4 倍速いことから、 CS 反応と比較して、反応時間の顕著な短縮が期待された。この検証を目的に pBS、*pGEM* および pTS1 の各プラスミド DNA を鋳型として用い、TS 法および CS 法による解析を行った場合、TS 法では、5 分反応で 99.5%以上（解読鎖長 400 bp）のシークエンス精度での解析が可能であったが、CS 法では解読可能なシークエンスシグナルが得ることはできなかった。以上の検討により、TS 法では、DNA シークエンス反応時間を、CS 法の DNA シークエンス反応時間の約 8%に短縮した。

第 7 章では、CS 法ではシグナルの急激な減衰や停止を伴い DNA シークエンス解析が困難な DNA 領域（難解読領域）に関して、TS 法による解析とその評価を行った。難解読領域である GC リッチな DNA 領域は、遺伝子発現調節機能を有するプロモーターやエンハンサー等の重要な DNA 領域およびその近傍に位置することが多い。さらに、抗生物質生産菌である放線菌のゲノム DNA には極めて GC リッチな領域がある。本章においては、CS 法で解析が困難であったヒトゲノム DNA 由来の DNA 断片の DNA シークエンス解析を TS 法によって行い、GC 含有率 80%以上の DNA 領域や GT リピート領域などについて、シグナル停止等を伴わず高いシークエンス精度での解析が可能であることを明らかにして TS 法の優位性を示した。

以上より、反応時間の顕著な短縮や未精製 PCR 産物を直接解析可能なこと、さらにこれまで難解読とされていた DNA 領域の DNA シークエンス解析が可能であることなどの優れた特長を明らかにして、新規な DNA シークエンス解析法としての TS 法の開発に成功した。

第 8 章では、本研究の総括を行った。

研 究 業 績

種 類 別	題名、　発表・発行掲載誌名、　発表・発行年月、　連名者（申請者含む）
1. 論文 ○（報文）	1. M. Izawa, N. Kitamura, N. Odake, F. Maki, K. Kanehira, H. Nemoto, M. Yamaguchi, A. Yamashita, N. Sasaki, M. Hattori, S. Kanayama, and Y. Yoneda. A Rapid and Simple Transcriptional Sequencing Method for GC-rich DNA Regions. *Jpn. J.Vet.Res.,* 53(3-4): 159-169, 2006
（報文）	2. K. Shibata, M. Izawa, Y. Hayashizaki, and M. Watahiki. Practical Application of Transcriptional Sequencing for GC-rich Templates. *J. Struct. Funct. Genomics.,* 4(1): 35-39, 2003
（報文）	3. Y. Shibata, P. Carninci, K. Sato, N Hayatsu, T. Shiraki, Y. Ishii, T Arakawa, A. Hara, N. Ohsato, M. Izawa, K. Aizawa, M. Itoh, K. Shibata, A. Shinagawa, J. Kawai, Y. Ota, S. Kikuchi, N. Kishimoto, M. Muramatsu, and Y. Hayashizaki. Removal of Poly A Tails from Full-Length cDNA Libraries for High-Efficiency Sequencing. *Biotechniques,* 31(5): 1042-1049, 2001
（報文）	4. J. Kawai, A. Shinagawa, K. Shibata, M. Yoshino, M. Itoh, Y. Ishii, T. Arakawa, A. Hara, Y. Fukunishi, H. Konno, J. Adachi, S. Fukuda, K. Aizawa, M. Izawa, (以下 82 名). Functional Annotation of a Full-Length Mouse cDNA Collection. *Nature,* 409: 685-690, 2001
○（報文）	5. M. Iwata, M. Izawa, N. Sasaki, Y. Nagumo, H. Sasabe, and Y. Hayashizaki. T7 RNA Polymerase Activation and Improvement of the Transcriptional Sequencing by Polyamines. *Bioorg. Med. Chem.,* 8 (8): 2185-2194, 2000
（報文）	6. K. Shibata, M. Itoh, K. Aizawa, S. Nagaoka, N. Sasaki, P. Carninci, H. Konno, J. Akiyama, K. Nishi, T. Kitsunai, H. Tashiro, M. Itoh, N. Sumi, Y. Ishii, S. Nakamura, M. Hazama, T. Nishine, A. Harada, R. Yamamoto, H. Matsumoto, S. Sakaguchi, T. Ikegami, K. Kashiwagi, S. Fujiwake, K. Inoue, Y. Togawa, M. Izawa, E. Ohara, M. Watahiki, Y. Yoneda, T. Ishikawa, K. Ozawa, T. Tanaka, S. Matsuura, J. Kawai, Y. Okazaki, M. Muramatsu, Y. Inoue, A. Kira, and Y. Hayashizaki. RIKEN Integrated Sequence Analysis (RISA) System-384-Format Sequencing Pipeline with 384 Multi Capillary Sequencer. *Genome Res.*, 10 (11): 1757-1771, 2000

(報文)	7．M. Itoh, T. Kitsunai, J. Akiyama, K. Shibata, M. Izawa, J. Kawai, Y. Tomaru, P. Carninci, Y. Shibata, Y. Ozawa, M. Muramatsu, Y. Okazaki, and Hayashizaki Y. Automated Filtration-Based High-Throughput Plasmid Preparation System. *Genome Res.*, 9 (5): 463-470, 1999
○ (報文)	8．N. Sasaki, M. Izawa, Y. Sugahara, T. Tanaka, M. Watahiki, K. Ozawa, E. Ohara, H. Funaki, Y. Yoneda, S. Matsuura, M. Muramatsu, Y. Okazaki, and Y. Hayashizaki. Identification of Stable RNA Hairpins Causing Band Compression in Transcriptional Sequencing and Their Elimination by Use of Inosine Triphosphate. *Gene*, 222 (1): 17-23, 1998
○ (報文)	9．M. Izawa, N. Sasaki, M. Watahiki, E. Ohara, Y. Yoneda, M. Muramatsu,Y. Okazaki, and Y. Hayashizaki. Recognition Sites of 3'-OH Group by T7 RNA Polymerase and Its Application to Transcriptional Sequencing. *J. Biol. Chem.*, 273 (23): 14242-14246, 1998
○ (報文)	10．N. Sasaki, M. Izawa, M. Watahiki, K. Ozawa, T. Tanaka, Y. Yoneda, S. Matsuura, P. Carninci, M. Muramatsu, Y. Okazaki, and Y. Hayashizaki. Transcriptional Sequencing: A Method for DNA Sequencing Using RNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* U S A. 95 (7): 3455-3460, 1998
(報文)	11．N. Sasaki, S. Nagaoka, M. Itoh, M. Izawa, H. Konno, P. Carninci, A. Yoshiki, M. Kusakabe, T. Moriuchi, M. Muramatsu, Y. Okazaki, and Y. Hayashizaki. Characterization of Gene Expression in Mouse Blastocyst Using Single-Pass Sequencing of 3995 Clones. *Genomics,* 49 (2): 167-179, 1998
(報文)	12．N. Sasaki, M. Izawa, M. Shimojo, K. Shibata, J. Akiyama, M. Itoh, S. Nagaoka, P. Carninci, Y. Okazaki, T. Moriuchi, M. Muramatsu, S. Watanabe, and Y. Hayashizaki. A Novel Control System for Polymerase Chain Reaction Using a RIKEN GS384 Thermal Cycler. *DNA Res.,* 4 (6): 387-391, 1997
(報文)	13．P. Carninci, C. Kvam, A. Kitamura, T. Ohsumi, Y. Okazaki, M. Itoh, M. Kamiya, K. Shibata, N. Sasaki, M. Izawa, M. Muramatsu, Y. Hayashizaki, and C. Schneider. High-Efficiency Full-Length cDNA Cloning by Biotinylated CAP Trapper. *Genomics,* 37 (3): 327-336, 1996

研 究 業 績

種 類 別	題名、　発表・発行掲載誌名、　発表・発行年月、　連名者（申請者含む）
2. 講演	１．　転写シークエンス用クローニングベクターを用いた転写シークエンス法による Dual End Sequencing 日本農芸化学会、仙台（講演要旨集 p. 138)、2002 年 3 月 伊澤真樹、小竹七々恵、北村暢夫、大原英治、山口光代、長谷川千巳、石井克典、糸岡利行、米田祐康、綿引正則 ２．　転写シークエンス法の改良とその有用性 日本分子生物学会、福岡（講演要旨集 p. 502)、1999 年 12 月 伊澤真樹、石川友一、柴田一浩、伊藤昌可、綿引正則、大原英治、船木弘子、米田祐康、田中巧、小澤香織、松浦修治、村松正実、林崎良英 ３．　T7 RNAP の伸長反応機構の解析及び活性化因子の探索 日本分子生物学会、横浜(講演要旨集 p. 322)、1998 年 12 月 伊澤真樹、佐々木宣哉, 綿引正則、大原英治、米田祐康、岩田正彰、南雲葉子、雀部博之, 田中巧、小澤香織、松浦修治、村松正実、岡崎康司、林崎良英 他 20 件
3. その他 （報文）	１．　S. Osada, M. Izawa, R. Saito, K. Mizuno, A. Suzuki, S. Hirai, and S. Ohno YSK1, a Novel Mammalian Protein Kinase Structurally Related to Ste20 and SPS1, But Is Not Involved in the Known MAPK Pathways. *Oncogene,* 14 (17): 2047-2057, 1997
（報文）	２．　S. Osada, M. Izawa, T. Koyama, S. Hirai, and S Ohno. A Domain Containing the Cdc42/Rac Interactive Binding (CRIB) Region of p65PAK Inhibits Transcriptional Activation and Cell Transformation Mediated by the Ras-Rac Pathway. *FEBS Lett.,* 404 (2-3): 227-233, 1997
（報文）	３．　S. Hirai, M. Izawa, S. Osada, G. Spyrou, and S Ohno. Activation of the JNK Pathway by Distantly Related Protein Kinases, MEKK and MUK. *Oncogene,* 12 (3): 641-650, 1996
（特許）	４．　牧文典、平野久夫、米田祐康、金山晋治、廣世志津子、伊澤真樹. イン・ビトロ転写反応を利用した機能性 RNA 分子の製造方法 特開 2005-006578

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導、御高配を賜りました早稲田大学理工学術院先進理工学部・桐村光太郎教授、木野邦器教授、常田聡教授に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。また、本論文をご査読いただき、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました桐村光太郎教授にあらためて深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、御指導をいただいた独立行政法人理化学研究所ゲノム科学総合研究センター遺伝子構造・機能研究グループ林崎良英プロジェクトディレクター、北海道大学獣医学部実験動物学講座佐々木宣哉准教授、株式会社ニッポンジーン金山晋治ゼネラルマネージャー、富山県衛生研究所綿引正則博士、和光純薬工業株式会社化成品研究所田中巧所長、東京大学新領域創成科学研究科服部正平教授、独立行政法人理化学研究所岩田正彰博士に深く感謝いたします。

また、本研究の機会を与えていただき、御指導、御協力を賜りました株式会社ニッポンジーン米田祐康社長、株式会社ニッポンジーンおよび株式会社ニッポンジーンテクの社員の皆様に深く感謝いたします。

最後に、勉学、研究の機会を与えてくださいました両親ならびに家族に深く感謝いたします。

2007 年 7 月

伊澤 真樹